

Aus dem
Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung
Universität des Saarlandes
Direktor
Prof. Dr. med. H. Madry

**Gentransfer des humanen Fibroblasten-
Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2) verbessert die
Reparatur osteochondraler Defekte - eine Studie
im adulten Großtiermodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Yannik Peter Morscheid
geboren am: 01. April 1989 in Lima/Peru

Tag der Promotion: 26. November 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry
Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke
Prof. Dr. med. Markus Huber-Lang

Für meine Eltern und Stephanie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen.....	VIII
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Problematik.....	3
2.2 Die osteochondrale Einheit.....	5
2.2.1 <i>Der hyaline Gelenkknorpel</i>	5
2.2.2 <i>Der subchondrale Knochen</i>	6
2.2.3 <i>Die Biologie der osteochondralen Einheit</i>	7
2.3 Einteilung der Knorpeldefekte.....	8
2.3.1 <i>Osteochondrale Defekte</i>	10
2.4 Biologie der osteochondralen Reparatur	11
2.5 Operative Therapiestrategien von Knorpeldefekten	12
2.6 Experimentelle Therapieansätze	13
2.6.1 <i>Übersicht</i>	13
2.6.2 <i>Therapeutische Faktoren</i>	15
2.6.3 <i>Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2)</i>	15
2.6.4 <i>Applikationswege</i>	16
2.6.5 <i>Gentransfersysteme</i>	17
2.6.5.1 Nicht-virale Gentransfermethoden	17
2.6.5.2 Virale Gentransfermethoden	17
2.6.5.3 Adeno-assoziierte virale Vektoren	18
2.7 Konzept der vorliegenden Arbeit	20
3. Fragestellung	22
4. Materialien	23
4.1 Lösungen, Puffer, Medien.....	23
4.2 Chemikalien	24
4.3 Zelllinien und Zellen.....	25
4.4 Antikörper und Enzyme	25

4.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
4.6	Computerprogramme	27
4.7	Operationsinstrumentarium- und materialien	27
5.	Methoden	28
5.1	Überblick	28
5.2	Herstellung rekombinanter adeno-assoziierten viralen Vektoren	29
5.2.1	<i>Plasmiddesign und Amplifikation der Plasmid-DNS</i>	30
5.2.2	<i>Transduktion</i>	30
5.3	Großtiermodell	31
5.4	Operationsverfahren	31
5.4.1	<i>Präoperative Versorgung und Anästhesie</i>	31
5.4.2	<i>Operative Vorgehensweise</i>	31
5.4.3	<i>Postoperative Versorgung</i>	33
5.5	Sektion	33
5.6	Makroskopische Evaluation	33
5.6.1	<i>Bewertungssystem nach Goebel et al.</i>	34
5.6.2	<i>Bewertungssystem nach Smith et al.</i>	34
5.7	Histologische Auswertung	35
5.7.1	<i>Entkalkung</i>	35
5.7.2	<i>Fixierung und Einbettung</i>	35
5.7.3	<i>Anfertigung der histologischen Schnitte</i>	35
5.7.4	<i>Histologische Färbungen</i>	36
5.7.4.1	<i>Safranin O/Echtgrün-Färbung</i>	36
5.7.4.2	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	36
5.7.5	<i>Immunhistochemische Färbung</i>	37
5.7.5.1	<i>Nachweis der Typ-I- und Typ-II-Kollagenexpression</i>	37
5.7.5.2	<i>Nachweis der FGF-2-Expression</i>	38
5.7.6	<i>Bewertungssysteme</i>	38
5.7.6.1	<i>Evaluation des osteochondralen Reparaturgewebes</i>	38
5.7.6.2	<i>Evaluation des angrenzenden Knorpels</i>	40
5.7.7	<i>Histomorphometrische Auswertung</i>	41
5.7.7.1	<i>Transgenexpression von FGF-2</i>	41
5.7.7.2	<i>Zelldichte</i>	41
5.7.7.3	<i>Typ-II- und Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität</i>	42
5.8	Biochemische Verfahren	43
5.8.1	<i>Papain-Verdau</i>	43

5.8.2	<i>DNS-Bestimmung (Hoechst 33258-Test)</i>	44
5.8.3	<i>Protein-Bestimmung (BCA-Test)</i>	44
5.8.4	<i>Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)</i>	44
5.9	Mikro-computertomografische Auswertung	45
5.9.1	<i>Mikro-Computertomographie</i>	45
5.9.2	<i>Fixierung</i>	45
5.9.3	<i>Scan, Rekonstruktion und Rotation</i>	45
5.9.4	<i>Standardisierte Definition der VOI</i>	46
5.9.5	<i>Analyse und 3D-Rekonstruktion</i>	46
5.9.6	<i>Morphologische Mikro-CT Parameter</i>	48
5.10	Statistische Verfahren	49
6.	Ergebnisse	50
6.1	FGF-2-Transgenexpression	50
6.2	Perifokale Arthrose	50
6.3	Reparatur des subchondralen Knochens	53
6.3.1	<i>Analyse der Mikrostruktur durch das mCT</i>	53
6.3.1.1	Bewertung der subchondralen Knochenplatte	54
6.3.1.2	Bewertung der subartikulären Spongiosa	55
6.3.2	<i>Histologische Bewertung des subchondralen Knochens</i>	58
6.4	Reparatur des Gelenkknorpels	59
6.4.1	<i>Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes</i>	59
6.4.1.1	Evaluation des Reparaturgewebes nach Goebel <i>et al.</i>	59
6.4.1.2	Evaluation des Reparaturgewebes nach Smith <i>et al.</i>	59
6.4.2	<i>Histologische Bewertung des Reparaturgewebes</i>	61
6.4.2.1	Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i>	61
6.4.2.2	Vergleich verschiedener Regionen	63
6.4.3	<i>Zelldichte</i>	64
6.4.4	<i>Typ-II- und Typ-I-Kollagenexpression</i>	65
6.4.5	<i>Biochemische Auswertung</i>	67
7.	Diskussion	69
7.1	Wirkung des rAAV-basierten Gentransfers auf das Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten	70
7.1.1	<i>Effekte auf die makroskopischen und histologischen Parameter der Knorpelreparatur</i>	70
7.1.2	<i>Effekte auf die Zellproliferation und Histomorphologie</i>	72

7.1.3	<i>Effekt auf die biochemischen Eigenschaften</i>	73
7.1.4	<i>Effekt auf die Reparatur des subchondralen Knochens</i>	74
7.2	Wirkung des rAAV-basierten Gentransfers auf den angrenzenden Knorpel	76
7.3	Vorgehensweise	77
7.3.1	<i>Analyseverfahren</i>	77
7.3.2	<i>Tiermodell</i>	79
7.3.3	<i>rAAV-Vektoren und FGF-2 als therapeutischer Faktor</i>	80
7.4	Klinische Relevanz	82
7.5	Zusammenfassung und Ausblick	84
8.	Literaturverzeichnis	85
9.	Publikationen und <i>Abstracts</i>	113
10.	Danksagungen	115
11.	Lebenslauf	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit	7
Abbildung 2: Einteilung der Knorpeldefekte	9
Abbildung 3: Überblick über Methoden des Gentransfers im Gelenkknorpel.....	14
Abbildung 4: Aufbau des AAV-Wildtyp-Genoms und der rAAV-Vektoren	19
Abbildung 5: Konzept der Studie.	21
Abbildung 6: Überblick über die angewandten Methoden	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der rAAV-Vektorherstellung	29
Abbildung 8: Operative Vorgehensweise	32
Abbildung 9: Einbettung	36
Abbildung 10: Bestimmung der Zelldichte.	42
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung und Auswertung	43
Abbildung 12: Schritte der Mikro-CT-Auswertung.	47
Abbildung 13: Definition der <i>regions of interest</i> (ROI)	47
Abbildung 14: Nachweis der hFGF2-Transgenexpression.....	50
Abbildung 15: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels.....	52
Abbildung 16: Überblick über die Mikro-CT Analysen des subchondralen Knochens..	53
Abbildung 17: Mikro-CT Analyse der subchondralen Knochenplatte	54
Abbildung 18: Mikro-CT Analyse der subartikulären Spongiosa	56
Abbildung 19: Histologische Bewertung des subchondralen Knochens.....	58
Abbildung 20: Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes	60
Abbildung 21: Histologische Bewertung des Reparaturgewebes.....	62
Abbildung 22: Übersicht der Gesamtpunktwerte der histologischen Bewertung.....	63
Abbildung 23: Bestimmung der Zelldichte	65
Abbildung 24: Immunhistologischer Nachweis der Typ-I-und II-Kollagenexpression...	66
Abbildung 25: Biochemische Auswertung	68

Alle Figuren und Illustrationen dieser Arbeit wurden selbstständig entworfen oder nach den angegebenen Quellen adaptiert. Sie wurden anschließend selbstständig mit einem entsprechenden Computerprogramm erstellt.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien.....	24
Tabelle 2: Chemikalien	25
Tabelle 3: Antikörper	25
Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 5: Computerprogramme.....	27
Tabelle 6: Makroskopisches Bewertungssystem (nach Goebel <i>et al.</i>)	34
Tabelle 7: Makroskopisches Bewertungssystem (nach Smith <i>et al.</i>)	35
Tabelle 8: Histologische Beurteilung der Knorpelreparatur (nach Sellers <i>et al.</i>)	40
Tabelle 9: Histologische Beurteilung des angrenzenden Knorpels (nach Little <i>et al.</i>)..	41
Tabelle 10: Semiquantitative Bewertung der Immunreaktivität.	43
Tabelle 11: Parameter der Mikro-CT Analyse	48
Tabelle 12: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels (mediale/lateral) ..	51
Tabelle 13: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels (kumulativ).....	52
Tabelle 14: Übersicht der Mikro-CT Analyse.....	57
Tabelle 15: Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes (nach Goebel <i>et al.</i>) .	59
Tabelle 16: Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes (nach Smith <i>et al.</i>)...	60
Tabelle 17: Gesamtbewertung der histologischen Knorpelreparatur	61
Tabelle 18: Histologische Bewertung der proximalen <i>Trochlea femoris</i>	64
Tabelle 19: Histologische Bewertung der distalen <i>Trochlea femoris</i>	64
Tabelle 20: Biochemische Auswertung (Reparaturgewebe, angrenzender Knorpel)...	68
Tabelle 21: Statistischer Vergleich der biochemischen Auswertung	68

Abkürzungen

(h)FGF-2	(humaner) Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (<i>fibroblast growth factor-2</i>)
(r)AAV-Vektor	(rekombinanter) adeno-assoziiertes viraler Vektor
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
Ad5/8	Adenovirus 5/8
ADAMTS	Familie von Metalloproteasen (<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
aqua bidest.	<i>aqua bidestillata</i>
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bit	Binärziffer (<i>binary digit</i>)
BMP-2	Knochenmorphogenetisches Protein 2 (<i>bone morphogenetic protein 2</i>)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>charged coupled device</i>)
cDNS	komplementäre (<i>copied</i>) Desoxyribonukleinsäure
DAB	3'3 Diaminobenzidin
DGOU	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DMMB	Dimethylmethylenblau (<i>dimethylmethylene blue</i>)
dSDNS	Dopplesträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	auf Englisch
EZM	extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GDF-5	Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (<i>growth differentiation factor 5</i>)
ggf.	gegenbenenfalls
h	Stunde
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
ICRS	<i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>
IGF-I	Insulinartiger Wachstumsfaktor I (<i>insulin-like growth factor I</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL-1, IL-17	Interleukin 1 und 17
kB	Kilobasen
kDA	Kilodalton, Einheit der Molekülmasse
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt

l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
M	mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomografie
ms	Millisekunde(n)
n.s.	nicht signifikant
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OAS	Arthroskopisches Bewertungssystem (<i>Oswestry Arthroscopy Score</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pSSV9	AAV-2 genomischer Klon nach Samulski
ROI	Bereiche von Interesse (<i>regions of interest</i>)
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde
sog.	sogenannte
SOX9	<i>SRV (sex determining region Y)-related HMG Box 9</i>
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TIMP(s)	Regulatorproteine für Metalloproteasen (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TNE	Tris-HCl- NaCl-EDTA-Pufferlösung
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
U	Einheiten (<i>units</i>)
ü.N.	über Nacht
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> , Maß für die Fadenstärke
vgl.	vergleiche
VOI	Volumen von Interesse (<i>volumes of interest</i>)
Wnt	Ligand, Signalprotein. "W" (<i>wingless</i>), "nt" (<i>Int-Gen</i>)
μ CT	Mikrofokus-Computertomographie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Zusammenfassung

Fragestellung. Fokale osteochondrale Defekte heilen nicht. Der direkte Gentransfer des humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2) mittels klinisch angepassten, rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektoren ist ein wirksames Werkzeug, um Reparaturprozesse in Knorpeldefekten zu aktivieren. In dieser Arbeit überprüfen wir die Hypothese, dass rAAV-vermittelter Gentransfer von hFGF-2 die Reparatur osteochondraler Defekte im translationalen *in vivo*-Großtiermodell verbessert.

Methoden. Nach Miniarthrotomie wurden standardisierte, osteochondrale Defekte (Durchmesser 3,5 mm) in den Kniegelenken (*Trochlea femoris*) von erwachsenen Merinoschafen gesetzt (n = 7). Die Defekte wurden mit rAAV-hFGF-2 Vektoren durch direkte Applikation in die Defekte behandelt und mit einem analogen (Reporter) rAAV-*lacZ*-Kontrollgentransfer verglichen (jeweils 10 µl). Nach sechs Monaten wurde die Knorpelreparatur durch bildgebende Verfahren und durch histologische, immunhistochemische sowie biochemische Verfahren evaluiert.

Ergebnisse. Nach sechs Monaten postoperativ führte eine effektive und prolongierte rAAV-vermittelte Überexpression von hFGF-2 zu einer verbesserten Reparatur des subchondralen Knochens, verglichen mit der Behandlung durch *lacZ*. Die rAAV-hFGF-2-Therapie verbesserte signifikant die individuellen Parameter des histologischen Bewertungssystems „Defektfüllung“, „Matrixanfärbbarkeit“ und „Zellmorphologie“ sowie den Gesamtpunktwert der Knorpelreparatur, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die rAAV-vermittelte Überexpression von hFGF-2 führte zu einer signifikant höheren Zelldichte und einer stärkeren Produktion von Typ-II-Kollagen bei gleichzeitiger signifikant niedrigeren Produktion von Typ-I-Kollagen im knorpeligen Reparaturgewebe. Makroskopisch lag eine signifikant verringerte perifokale Arthrose vor.

Schlussfolgerung. Der rAAV-vermittelte Gentransfer von hFGF-2 verbesserte die strukturelle osteochondrale Reparatur im klinisch relevanten Großtiermodell nach sechs Monaten *in vivo*. Die Verabreichung therapeutischer (FGF-2) rAAV-Vektoren in fokale osteochondrale Defekte könnte in der nahen Zukunft neue Möglichkeiten zur Verbesserung der osteochondralen Reparatur eröffnen.

Abstract

Gene transfer of hFGF-2 improves the repair of osteochondral defects

Introduction. Focal osteochondral defects do not heal. Direct gene transfer of the human fibroblast growth factor 2 (hFGF-2) via clinically adapted recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector is a powerful tool to durably activate the repair processes in sites of articular cartilage injury. In the present study, we tested the hypothesis that rAAV-mediated gene transfer of hFGF-2 improves the repair of osteochondral defects in a large translational animal model *in vivo*.

Methods. After mini-arthrotomy, standardized osteochondral defects (diameter 3.5 mm) were created in the stifle joints (*trochlea femoris*) of adult merino sheep (n = 7). Each knee joint was treated with an rAAV human FGF-2 (hFGF-2) vector by direct administration into the defects relative to control (reporter) rAAV-*lacZ* gene transfer (10 µl each defect). After six months, cartilage repair was evaluated by imaging techniques, histological, immunohistochemical and biochemical methods.

Results. After six months *in vivo*, effective and prolonged rAAV-mediated hFGF-2 overexpression led to better subchondral bone repair *versus lacZ* treatment. rAAV-hFGF-2-treatment improved significantly individual parameter „filling of the defect“, „matrix staining“, „cellular morphology“ and the overall score of cartilage repair of the histological scoring system, each compared with the control group. The rAAV-mediated overexpression of hFGF-2 led to significantly higher cell densities and increased production of type-II-collagen, while type-I-collagen production was significantly decreased in the cartilaginous repair tissue. Macroscopic findings displayed a reduced perifocal osteoarthritis.

Conclusion. rAAV-mediated overexpression of hFGF-2 improved structural parameters of osteochondral repair in a clinically relevant large animal model over time *in vivo*. Application of therapeutic (FGF-2) rAAV vectors in sites of focal osteochondral defects may offer novel tools to improve osteochondral repair in a close future.

2. Einleitung

2.1 Problematik

Die Therapie fokaler Knorpeldefekte ist ein ungelöstes Problem in der Orthopädie und orthopädischen Chirurgie. Ein wesentlicher Grund dafür ist, dass der hyaline Gelenkknorpel ein sehr eingeschränktes intrinsisches Heilungspotential besitzt [27]. Osteochondrale Defekte nehmen eine Sonderrolle ein, da sie definitionsgemäß den Gelenkknorpel und den darunterliegenden subchondralen Knochen involvieren [89]. Osteochondrale Defekte haben eine Inzidenz von bis zu 10% aller Knorpeldefekte [266] und sind häufig am Kniegelenk lokalisiert [177]. Osteochondrale Knorpelschäden können das Resultat verschiedener Ätiologien sein [213]. Neben primären, traumatischen Ursachen führen auch Osteonekrosen, die Osteochondrosis dissecans oder Arthrose zu lokalen osteochondralen Schädigungen [176,264]. Die bisher etablierten Therapien osteochondraler Defekte richten sich nach dem Stadium, der Defektgröße und der Tiefe der Läsion [213].

Die chirurgische Behandlung von großflächigen osteochondralen Defekte des Kniegelenkes ist erschwert [275], obwohl heute eine Vielzahl an modernen, operativen Therapiemethoden existieren [33]. Unbehandelt kommt es zu einem signifikanten Fortschreiten der Degeneration in Knorpel, Meniskus und Knochenmark [121]. Primäre Knorpelschäden begünstigen daher, insbesondere nach Schluss der Wachstumsfugen, die Entstehung einer Früharthrose [79,94,167,232] und erfordern häufig die Versorgung durch eine Endoprothese [242] als *Ultima Ratio*. Die Arthrose gilt in Deutschland und weltweit als die am häufigsten vorkommende Gelenkerkrankung [265,269] mit jährlich erheblichen volkswirtschaftlichen Kosten [221]. Auch bei der Vielzahl an klinischen Therapiemöglichkeiten die uns zur Verfügung stehen, kann geschädigter hyaliner Gelenkknorpel nicht vollständig regeneriert werden [46]. Daher bleibt die Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels bis heute eine der größten Herausforderungen der orthopädischen Chirurgie [155].

Ein Ansatz der aktuellen Forschung ist es, mit Hilfe innovativer Therapieverfahren biologisch und mechanisch gleichwertiges Knorpelregenerationsgewebe herzustellen. Die Gentherapie stellt dabei ein Mittel dar, um Reparaturvorgänge in osteochondralen Defekten durch Aktivierung der Chondrogenese in ruhenden Zellen wie mesenchymale Stammzellen zu verbessern [39,61,65,158]. Es stehen eine Vielzahl an Transportsystemen zur Verfügung, um Gene in ihre Zielzellen zu schleusen. Die

Verwendung viraler Gentransfersysteme stellt eine interessante und vielversprechende Strategie in der orthopädisch-regenerativen Medizin dar [260]. Die Zielgene können dabei für verschiedene therapeutische Faktoren, wie Wachstumsfaktoren oder Signalproteine, kodieren und in den Zielzellen überexprimiert werden. Der Gentransfer des insulinartigen Wachstumsfaktor I (IGF-I), alleine [47] oder kombiniert mit dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) [182], transformierender Wachstumsfaktor *beta* (TGF- β) [51], knochenmorphogenetisches Protein (BMP-2, -6) [175] und dem Transkriptionsfaktor SOX9 [45] wurde durch adenovirale und rekombinante adeno-assoziierte virale (rAAV) Vektoren bereits erfolgreich durchgeführt. Jedoch konnte eine langfristige Wirkung auf die Knorpelreparatur an einem klinisch relevanten Großtiermodell bislang nicht gezeigt werden.

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2) ist ein potenter therapeutischer Faktor, welcher reparative Vorgänge in Chondrozyten, Knorpelgewebe und mesenchymalen Stammzellen in Gang setzt [44,209,252] und durch rAAV-vermittelte Überexpression zu einer Verbesserung der Knorpelreparatur im Kleintiermodell (Kaninchen) führte [40,105]. In der vorliegenden Arbeit favorisierten wir daher die Verwendung von rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektoren. Sie gelten als hoch effiziente und sichere Gentransfervehikel mit geringer Immunogenität [17,39,65,158].

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Überprüfung der Hypothese, dass direkter, rAAV-vermittelter Gentransfer von humanem FGF-2 die osteochondrale Reparatur *in vivo* im Vergleich zum Kontrollgentransfer mit dem *lacZ*-Reportergen verbessert. Wir wählten ein klinisch relevantes Großtiermodell am erwachsenen Schaf und analysierten die Reparatur der osteochondralen Einheit nach einem Zeitraum von 6 Monaten. Das Kniegelenk des Schafes weist wichtige Eigenschaften des menschlichen Kniegelenks auf [200,201]. Als Ort des Gentransfers wählten wir die *Trochlea femoris* des Kniegelenks des Schafes. Wir verwendeten in diesem translationalen Modell etablierte makroskopische, histo- und immunhistochemische, biochemische sowie mikro-computertomographische Methoden, welche vergleichende Analysen der gesamten osteochondralen Einheit ermöglichten.

2.2 Die osteochondrale Einheit

Als osteochondrale Einheit wird die Funktionseinheit aus hyalinen Gelenkknorpel, kalzifizierten Knorpel sowie dem darunter liegenden subchondralen Knochen in diarthrotischen Gelenke bezeichnet [89] (Abbildung 1). Die Bestandteile interagieren dabei als funktionelle Partner. Pathologische Veränderungen der Struktur oder Physiologie der einen Funktionseinheit wirken sich auf die andere Funktionseinheit aus [163,205]. Die funktionellen Partner leiten einwirkende Kräfte weiter und verarbeiten diese [69,88]. Die Betrachtung der gesamten osteochondralen Einheit ist wichtig für das Verständnis der Pathophysiologie von Gelenkerkrankungen und die Planung von Knorpeltherapien.

2.2.1 Der hyaline Gelenkknorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, anervales und alymphatisches Gewebe, der die Gelenkflächen aller echten Gelenke überzieht [191]. Chondrozyten tragen mit einem Anteil von nur ein bis zwei Prozent am wenigsten zum Gesamtknorpelvolumen bei [195]. Diese hoch differenzierten, mesenchymalen Zellen sind in Chondronen angeordnet und von einer basophilen Matrix umgeben, dem sogenannten Knorpelhof. Chondrone sind in ein hoch komplexes Netzwerk aus extrazellulärer Matrix eingebettet. Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist Wasser (65-80%) sowie Proteoglykane und Kollagenfasern. Proteoglykane sind Makromoleküle mit einem Kohlenhydratanteil von bis zu 95% und besitzen eine wesentliche Wasserbindungskapazität und Quelldruck. Das Aggrekan-Molekül stellt das Hauptproteoglykan des Knorpels dar und bildet damit die Grundlage für die Elastizität des Gewebes [88]. Es wird durch zwei Verbindungsproteine an Hyaluronsäure (Hyaluronan) gebunden [124]. Kollagene sind im Körper ubiquitär vorhandene Proteine, die für die mechanische Festigkeit im hyalinen Knorpel sorgen. Im intakten hyalinen Knorpel ist Typ-II-Kollagen mit einem Anteil von 90-95% das Hauptkollagen und verläuft arkadenförmig durch fast alle Schichten [170]. Weitere, im hyalinen Knorpel vorkommende Kollagene sind Typ-VI-, -IX-, -X-, - und -XI-Kollagen. Im Lichtmikroskop zeigen sich Kollagenfasern im intakten Knorpel maskiert. Kommt es zu einer degenerativen Veränderung, werden Kollagenfibrillen demaskiert (sog. „Asbestfasern“) [178]. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie kann so zwischen normalem Knorpelgewebe und Reparaturgewebe unterschieden werden. Hyaliner, nicht-kalzifizierter Gelenkknorpel kann in verschiedene Schichten und organisatorische Einheiten eingeteilt werden [116,156] (Abbildung 1). In der oberflächlich gelegenen, superfiziellen Zone sind Chondrozyten parallel zur Gelenkoberfläche angeordnet und

treten in Kontakt mit der Synovialflüssigkeit. Die Anzahl der Chondrozyten sowie der Anteil an Proteoglykanen ist reduziert, der Kollagengehalt ist hoch. Die mittlere Zone (Übergangszone) zeigt eine teilweise Organisation der Chondrozyten in Chondronen. Der Anteil an Proteoglykanen steigt und Kollagenfibrillen sind arkadenförmig angeordnet. An die mittlere Zone schließt sich die tiefe (radiäre) Zone an. Hier finden sich in Säulen gestapelte Chondrozyten. Der Proteoglykangehalt ist hier am höchsten und Kollagenfibrillen sind senkrecht zur Gelenkoberfläche angeordnet. Kalzifizierter Knorpel befindet sich in einer 20 bis 250 µm dicken Zone (kalzifizierte Zone) und ist geprägt von aktiven, physiologischen Umbauprozessen [195]. Die kalzifizierte Zone trägt kleine, runde Chondrozyten. Typ-II-Kollagenfibrillen haben ihren Ursprung in dieser Zone [156]. Zwischen tiefer Zone und kalzifizierter Zone befindet sich ein ca. 5 µm dünnes Band aus mineralisiertem Knorpel, die sogenannte *tidemark* [149]. Die kalzifizierte Zone ist das Verbindungsstück zwischen Knorpel und dem steifen Knochengewebe. Die Zone des kalzifizierten Knorpelgewebes hat die Aufgabe, Kräfte zu vermitteln und die Diffusion von Stoffen aus dem subchondralen Knochen zur tiefen Zone des Gelenkknorpels zu limitieren [192].

2.2.2 *Der subchondrale Knochen*

Der subchondrale Knochen kann in die subchondrale Knochenplatte und die diaphysär gelegene subartikuläre Spongiosa unterteilt werden [156]. Die Knochenplatte liegt direkt unter der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels und wird durch die sogenannte Zementlinie von dieser Schicht getrennt. Sie besteht aus 0,2 bis 0,4 mm dünnen, dicht gepackten Lamellen. Einzelne mechanische und strukturelle Parameter variieren je nach Lokalisation und Belastung im Gelenk. So ist die subchondrale Knochenplatte in Regionen hoher mechanischer Belastung dichter, dicker [98] und besitzt eine höhere Vaskularisationsdichte [133]. In tieferen Regionen der subchondralen Zone vergrößern sich die spongiösen Räume und verlaufen parallel zur Diaphyse. Diese Schicht wird als subartikuläre Spongiosa bezeichnet. Sie ist metabolisch aktiver als die subchondrale Platte, bedingt durch die ständigen Umbauprozesse der Osteoblasten und Osteoklasten als Reaktion auf mechanische Reize [195]. Die Stabilität des Knochens korreliert dabei mit der Dichte an Trabekeln, ebenfalls abhängig von der Lokalisation im Gelenk. Der subchondrale Knochen ist durch sensorische und sympathische Nervenfasern innerviert. Blutgefäße können die Zementlinie durchbrechen und bis in die kalzifizierte Zone reichen und hier die Ernährung der tiefen Zone durch Diffusion der Nährstoffe sicherstellen. Hauptkollagen des subchondralen Knochens ist das Typ-I-Kollagen. Neben dem Knochengewebe kommt es auch in Sehnen, Bändern und der Haut vor. Im Rahmen

degenerativer Prozesse oder in faserknorpeligen Reparaturgewebe ist es im Gelenkknorpel nachweisbar [178]. Kollagenfasern kreuzen Gelenkknorpel und subchondralen Knochen nicht. Die beiden Gewebe werden nur durch dreidimensionale Verzahnung zusammengehalten [192]. Der subchondrale Knochen hat zum einen die Aufgabe der Ernährung des Gelenkknorpels, zum anderen spielt er eine wichtige Rolle in der mechanischen Unterstützung des Gelenkknorpels durch die Absorption von Gewichts- und Stoßkräften [116].

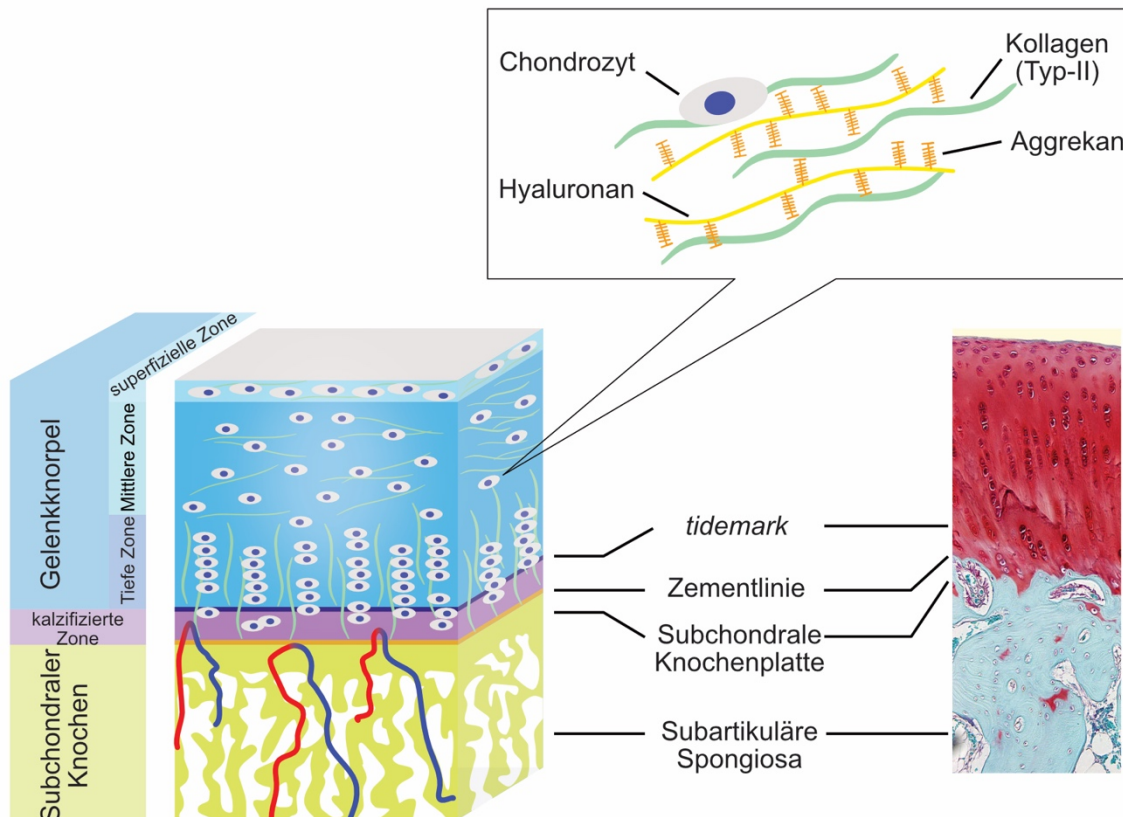


Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit. Schematische Darstellung und beispielhafter, histologischer Schnitt in Safranin O/Echtgrün-Färbung.

2.2.3 Die Biologie der osteochondralen Einheit

Die Ernährung des Gelenkknorpels wird durch Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit und basal durch Diffusion aus den Kapillaren des subchondralen Knochens sichergestellt [116]. Chondrozyten liegen als terminal differenzierte Zellen ohne Proliferationsaktivität vor, welche die extrazelluläre Matrix durch ihre geringe Stoffwechselaktivität aufrecht erhalten [41]. Die extrazelluläre Matrix spielt eine zentrale Rolle in der Knorpelhomöostase. Das Aggrecan vermittelt, als wichtigstes Proteoglykan der extrazellulären Matrix, Chondrozyt-Chondrozyt- sowie Chondrozyten-Matrixinteraktionen [124]. Der Verlust von Aggrecananteilen ist ein Hauptindikator der

Früharthrose [117]. Das Kollagenfasernetz und die Glykosaminoglykan-gebundene interstitielle Flüssigkeit des Knorpelgewebes wirken als biochemisch-hydrodynamisches Dämpfungssystem: Bei Zunahme der biomechanischen Last kommt es zu einer druckinduzierten Umverteilung der interstitiellen Flüssigkeit in weniger komprimierte Anteile der extrazellulären Matrix. Nach Abnahme der Last fließt die Flüssigkeit durch ihre Elektrostatik wieder zurück und wird teilweise von Glykosaminoglykan reabsorbiert. Dadurch erlangt der hyaline Knorpel seine ursprüngliche Form [145]. Im hyalinen Gelenkknorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen matrix-aufbauenden (anabolen) und matrix-abbauenden (katabolen) Prozessen, welche durch ein komplexes molekulares Signalnetzwerk reguliert werden. Auf der anabolen Seite des Chondrozytenmetabolismus stehen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β), knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) und insulinartiger Wachstumsfaktor I (IGF-I) sowie Inhibitoren (TIMP) von Matrixmetalloproteasen (MMPs). Katabol wirken dagegen Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukine (z.B. IL-1 β), proteolytische Enzyme (MMP und ADAMTS) oder Kollagenasen. Mit zunehmenden Alter verringert sich die mitogene und synthetische Aktivität von humanen Chondrozyten, ebenso die Ansprechbarkeit auf anabol wirkende Cytokine und mechanische Stimuli [171] sowie die Telomerase-Aktivität als Indikator für die zelluläre Seneszenz und Replikationsfähigkeit [268]. Im subchondralen Knochen finden sich mesenchymale Stammzellen und weitere, multipotente Zellen des Knochenmarks. Diese Zellen spielen eine Rolle in der spontanen Knorpelreparatur (Kapitel 2.4) oder bei operativen Therapien (Kapitel 2.5).

2.3 Einteilung der Knorpeldefekte

Knorpeldefekte können in fokale Läsionen und degenerative Läsionen unterteilt werden. *Per definitionem* sind fokale Knorpeldefekte innerhalb der Gelenkfläche abgegrenzt und von einem sonst intakten hyalinen Gelenkknorpel umgeben, die sogenannte „Defektschulter“. Degenerative Läsionen sind typischerweise gering demaskiert [67]. Vielzählige Erkrankungen können zu einem Gelenkknorpeldefekt führen. Dabei sind fokale Defekte oft Folge eines Traumas, einer Osteonekrose oder einer Osteochondrosis dissecans [159] und kommen sehr häufig retropatellar und am medialen Femurkondylus vor [243]. Degenerative Läsionen werden häufig durch Bandinstabilitäten, Meniskusschäden, Achsenfehlstellungen oder Arthrose hervorgerufen [267]. Bei fokalen Defekten unterscheidet man zwischen chondralen und osteochondralen Defekten. Chondrale Defekte betreffen ausschließlich die kartilaginäre Zone der osteochondralen

Einheit [39,190]. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Knorpeldefekte [107] und können weiter in teilschichtige und vollschichtige Defekte kategorisiert werden (Abbildung 2). In der klinischen Behandlung spielt die exakte Klassifizierung der Knorpelschäden anhand von Tiefenausdehnung, Defektgröße, Lokalisation, Zustand des umgebenen Knorpels, dem Zustand des subchondralen Knochens, Begleitschäden und Genese eine wichtige Rolle für die Therapieentscheidung [213]. Aktuelle empfiehlt die DGO (Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie) die Verwendung der *ICRS-Klassifikation* (*International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society*, Grad 0 bis 4b) [24] zur klinischen Einteilung von Knorpeldefekten auf Basis der 1989 entwickelten Klassifikation von Noyes und Stabler [190].

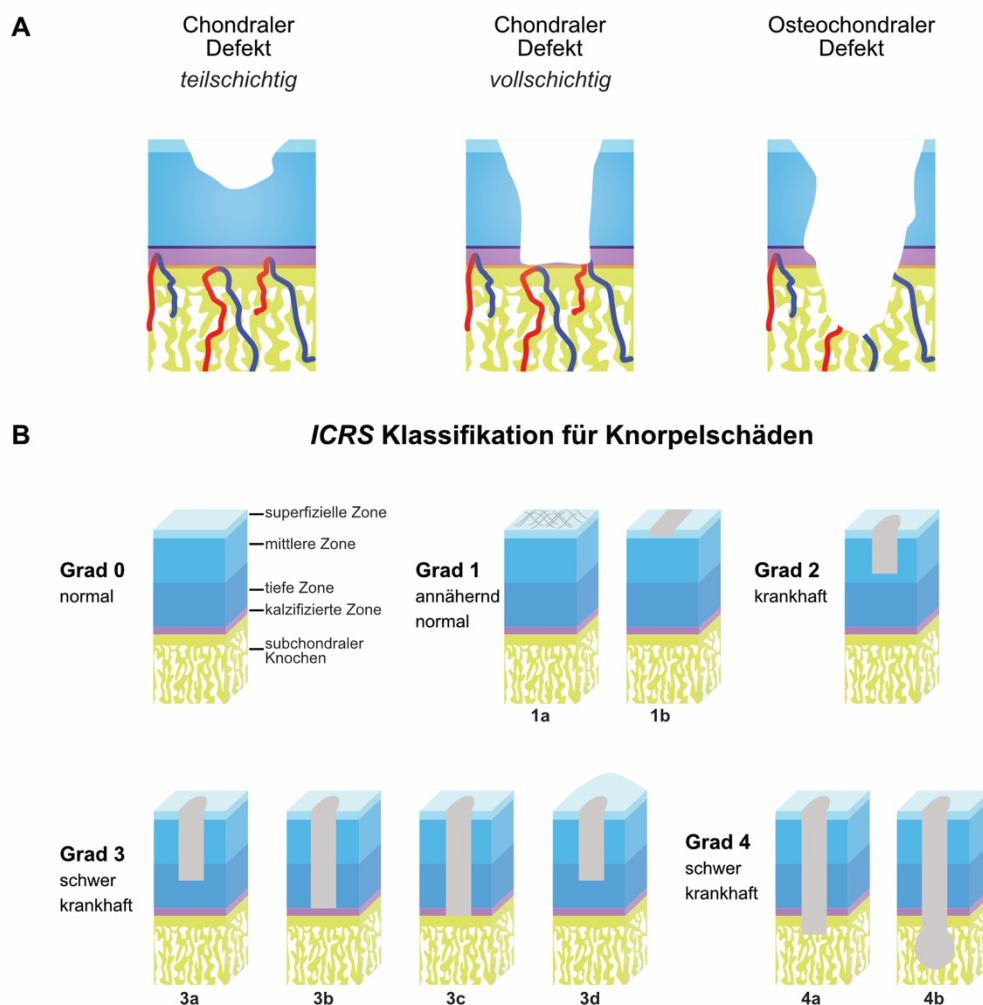


Abbildung 2: Einteilung der Knorpeldefekte. Einteilung in chondrale teil- und vollschichtige Defekte sowie osteochondrale Defekte (A). Einteilung nach der *ICRS-Klassifikation* (B). Grad 1a: Intakte Oberfläche mit Fibrillationen und/oder Knorpelerweichungen. Grad 1b: zusätzliche, oberflächliche Rissbildung. Grad 2: teilschichtiger Knorpeldefekt < 50% der normalen Knorpeldicke. Grad 3: Defekte > 50% der normalen Knorpeldicke ohne Involvement der kalzifizierten Zone (3a), bis zur kalzifizierten Zone reichend (3b), bis zum subchondralen Knochen reichend (3c), mit zusätzlicher Blasenbildung (3d). Grad 4: osteochondrale Defekte ohne (4a) oder mit begleitendem Knochendefekt (4b). Abbildung adaptiert aus dem *ICRS Cartilage Injury Evaluation Package* (www.cartilage.org).

2.3.1 Osteochondrale Defekte

Osteochondrale Defekte reichen per Definition immer durch das Knorpelgewebe in den subchondralen Knochen und haben verschiedene Ursachen. Der Ausdruck „osteochondrale Läsionen“ stellt dabei ein Überbegriff für unterschiedliche Pathologien dar, die den subchondralen Knochen und den darüber liegenden Knorpel betreffen. Die Osteochondrosis dissecans ist eine aseptische Knochennekrose und beschreibt eine erworbene Verletzung des subchondralen Knochens. Der im englischen Sprachraum verwendete Ausdruck „osteochondritis“ wurde von Franz König 1888 geprägt, welcher von einer Entzündung als Ursprung der Erkrankung ausging [12]. Die genaue Ätiologie der Erkrankung wird jedoch kontrovers diskutiert und ist weiterhin unklar [238]. Die Osteochondrosis dissecans betrifft am Häufigsten das Knie- sowie das obere Sprunggelenk und das Ellenbogengelenk [57]. Osteochondrale Defekte können durch eine Osteochondrosis dissecans entstehen und dabei den darüber liegenden Gelenkknorpel sekundär betreffen [39,190]. Auch andere Pathologien wie Osteonekrosen oder osteochondrale Frakturen (z.B. nach einer traumatischen Patellaluxation) führen zu osteochondralen Defekten. Durch die Involvierung des subchondralen Knochens wird der Knochenmarkraum eröffnet, es bildet sich ein Blutgerinnsel und es kommt zu einem Einstrom von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt [207]. Die biomechanische und homöostatische Veränderung der subchondralen Einheit führen oft zu einer weiteren Degeneration des gesamten Gelenks und schließlich auch zur früheren Ausbildung einer sekundären Arthrose [89]. Bei osteochondralen Defekten ist die exakte Klassifikation wichtig für die Entscheidungsfindung im klinischen Alltag. Die Klassifikation von Berndt und Harty wurde ursprünglich für die Einteilung der talaren Osteochondrosis dissecans entwickelt [15]. Sie wurde von J. Bruns [26] erweitert und schließt klinische Symptome, röntgenmorphologische Veränderungen, Signalalterationen in der Magnetresonanztomografie (MRT) sowie arthroskopisch erkennbare Knorpelveränderungen ein. Diese Veränderungen korrelieren mit pathohistologischen Veränderungen. Neben der Klassifikation für Knorpelschäden existiert von der ICRS auch eine Klassifikation für reine osteochondrale Läsionen [24]. Die operative Therapie von osteochondralen Defekten hat das Ziel, sowohl eine hinreichende Knorpel- als auch Knochenheilung zu erzielen (siehe Kapitel 2.5).

2.4 Biologie der osteochondralen Reparatur

Die Regenerationsfähigkeit von verletztem Knorpelgewebe ist begrenzt [27]. Regeneration und Reparatur von Gelenkknorpel müssen streng voneinander getrennt werden. Als Resultat der Knorpelreparatur findet man ein Reparaturgewebe, welches makroskopische Ähnlichkeiten mit nativen, hyalinen Knorpel aufweist, sich jedoch in Morphologie und biochemischer Zusammensetzung wesentlich unterscheidet [207]. Es ähnelt dem Faserknorpel und zeigt eine geringere mechanische Belastbarkeit auf [71]. Im Gegensatz dazu weist die Knorpelregeneration exakte makroskopische, mikroskopische und biochemische Eigenschaften des nativen hyalinen Gelenkknorpels auf [31]. Eine vollständige Knorpelregeneration kann nur in der embryonalen Entwicklung festgestellt werden, sie erfolgt nicht beim Erwachsenen [32]. Chondralen Defekten fehlt der Zugang zu pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark. Randständige Chondrozyten sowie Synovialzellen sind die einzigen Zellpopulationen, die zu Reparaturprozessen beitragen können [114]. Von diesen Zellen ausgehend wurde am Kaninchen- und Minischwein-Modell die Bildung von Reparaturgewebe nachgewiesen [112]. Eine komplette Defektauffüllung wird hier oftmals nicht erreicht [207] und das Reparaturgewebe zeigt Diskontinuitäten an den Integrationszonen sowie eine Hypozellularität im angrenzenden hyalinen Knorpel auf [118]. Im Rahmen der spontanen Reparatur von osteochondralen Defekten oder nach markraumeröffnenden Verfahren (Kapitel 2.5) kommt es nach Penetration des subchondralen Knochens zur Migration von mesenchymalen Stammzellen vom subchondralen Knochen in den Defekt. Hier differenzieren die Stammzellen zu Chondrozyten und bilden ein faserknorpeliges Reparaturgewebe [164]. Die ablaufenden Reparaturprozesse beruhen auf dem Prinzip der Chondrogenese und werden durch verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren reguliert. Proteoglykane und Typ-I-Kollagen sind nach einigen Wochen nachweisbar. Das neu gebildete Gewebe ist durch eine hohe Typ-I-Kollagen- und eine niedrige Typ-II-Kollagen-Konzentration charakterisiert. Zwar steigt der Gehalt an Typ-II-Kollagen und Aggrekan mit der Zeit an [6,7], die Anordnung der Typ-II-Kollagenfibrillen entspricht jedoch nicht der des normalen hyalinen Knorpelgewebes. Auch die Transkriptionsaktivität im normalen Knorpel ist für Proteoglykane und nichtkollagene Adhäsionsproteine höher [179]. Die Reparatur des subchondralen Knochens verläuft ähnlich den Vorgängen während der Frakturheilung [29]. Knochenspezifische Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 und der Ligand *Wnt* regulieren die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Prä-Osteoblasten und reifen Osteoblasten im subchondralen Knochen. Die Innervation des Knochens moduliert die Knochenregenerations- und Umbauprozesse und ist an der Knorpelhomöostase beteiligt

[233]. Reparaturmechanismen können auch durch sich wiederholende Mikrotraumata ausgelöst werden. Dies kann zu subchondraler Sklerosierung und der Ausbildung einer neuen kalzifizierten Zone führen [116]. Im subchondralen Knochen werden eine Reihe von langfristigen Veränderungen beobachtet. So kommt es im Tiermodell und beim Patienten häufig zu einem Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte, der Bildung von intraläsionalen Osteophyten sowie zum Auftreten von subchondralen Knochenzysten oder Veränderungen der subchondralen Mikroarchitektur [198,199]. Als Ursache dieser Veränderungen werden mechanosensitive Osteoblasten vermutet, welche durch Veränderungen der Biomechanik im osteochondralen Defekt aktiviert wurden [231]. Das gebildete, faserknorpelige Reparaturgewebe weist nach einigen Monaten erste Zeichen einer Degeneration auf und der Defekt kann sich in den angrenzenden hyalinen Gelenknorpel hinein ausweiten [118].

2.5 Operative Therapiestrategien von Knorpeldefekten

Die Möglichkeiten der chirurgischen Knorpeltherapie können grundsätzlich in zellgebundene und zellfreie Verfahren unterteilt werden. Als zellgebundene Verfahren für chondrale Knorpeldefekte existieren einige etablierte, markraumeröffnende Operationsverfahren wie die Mikrofrakturierung [246], Pridie-Bohrung [219] und die Abrasionsarthroplastik [120]. Durch Eröffnung des subchondralen Knochens kommt es zu einer Einblutung in den Defekt, Einstrom von Stammzellen sowie Wachstumsfaktoren und schließlich zur Ausbildung eines faserknorpeligen Reparaturgewebes [30]. Die Mikrofrakturierung ist die am häufigsten verwendete Technik zur Behandlung von kleinen ($\leq 2,5 \text{ cm}^2$) Knorpeldefekten am Kniegelenk [264]. Das zweizeitig durchgeführte Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) ermöglicht die Bildung von knorpelähnlichem Reparaturgewebe [211]. Sie basiert auf der Isolation und Expansion von Knorpelzellen aus humanem Gewebe [168]. Zunächst wird ein Knochen-Knorpel-Zylinder außerhalb der Hauptbelastungszone entnommen, ca. vier Wochen kultiviert und anschließend in den Knorpeldefekt implantiert. Die Indikation für eine ACT ist ab einer Defektgröße von $2,5 \text{ cm}^2$ bei jungen, sportlich aktiven Patienten bei einem symptomatischen Knorpelschaden (Grad III/IV nach *ICRS*) gegeben. Heute kommen verschiedene Biomaterialien als Matrix der Knorpelzellen zur Verwendung (matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation, MACT), was auch eine minimalinvasive Transplantation ermöglicht. Die ACT bzw. MACT zeigt in einigen Studien im Vergleich zur Mikrofrakturierung eine Überlegenheit bei der Behandlung größerer Defekte auf [104]. Osteochondrale Transferverfahren bringen eine physiologisch intakte, native osteochondrale Einheit in einen Defekt ein [214]. Dabei

werden in einem einzeitigen Verfahren Knorpel-Knochen-Zylinder außerhalb der Hauptbelastungszone entnommen und diese dann knöchern in den vorbereiteten Knorpeldefekt verblockt (sog. *Press-fit-Technik*) [97]. Indikationen sind fokale Knorpeldefekte mit Involvierung des subchondralen Knochens bis zu einer Größe von ca. 3 bis 4 cm². Sowohl allogene als auch autologe Verfahren wie die OATS-Technik (Osteochondrales-Autograft-Transfer-System) zeigen in Langzeitstudien gute Ergebnisse [148,214]. Bei zellfreien Therapieverfahren werden Zellen nicht kultiviert und können somit einzeitig angewandt werden. Klinisch verwendet wird auch das sog. AMIC- („autologe matrixinduzierte Chondrogenese“) Verfahren. Hier wird der Knorpeldefekt nach Mikrofrakturierung mit einer Membran abgedeckt. Die klinische Evidenzlage im Vergleich zu etablierten Verfahren ist hier noch unzureichend [80]. Für osteochondrale Defekte befinden sich zurzeit nur wenige zellfreie Systeme im klinischen Gebrauch [25,35]. Die Verwendung von Membranen und strukturellen Gerüsten („*scaffolds*“) zählt zum sogenannten *Tissue Engineering*. Dies beschreibt allgemein die zielgerichtete Neubildung von Gewebe mit Hilfe einer Vielzahl an biomedizinischen Verfahren und Techniken [255]. Ein Hauptproblem in der klinischen Anwendung ist die ungenügende Einheilung der Multiphasen-Implantate in den subchondralen Knochen sowie die fehlende Osteokonduktion oder Ossifikation [11,55]. Die Evidenz ist hier auf wenige Fallstudien limitiert [128]. Die unzureichende Studienlage und fehlende Regeneration des subchondralen Knochens verdeutlicht die Notwendigkeit, neue experimentelle Ansätze zu finden, um die Reparatur der gesamten osteochondralen Einheit zu verbessern.

2.6 Experimentelle Therapieansätze

2.6.1 Übersicht

Als Gentherapie definiert man den Transfer von Genen oder Gensequenzen in somatische Zellen von Patienten mit dem Ziel, dadurch einen therapeutischen Nutzen zu erlangen [188]. Die Übertragung der Gensequenzen wird als Gentransfer bezeichnet. Für das Einschleusen von Gensequenzen in Zielzellen stehen verschiedene virale und nicht-virale Gentransfersysteme zur Verfügung, sogenannte Gentransfer-Vektoren. Allen Gentransfersystemen ist gemein, dass genetisches Material die Zellmembran passieren und den Zellkern erreichen muss. Ein solcher Gentransfer mit viralen Systemen wird Transduktion genannt, ein Transfer mit nicht-viralen Systemen wird als Transfektion bezeichnet (Abbildung 3). Um einen therapeutischen Gentransfer zu verwirklichen muss eine ausreichende, biologisch aktive Menge an Proteinen über einen bestimmten Zeitraum synthetisiert werden.

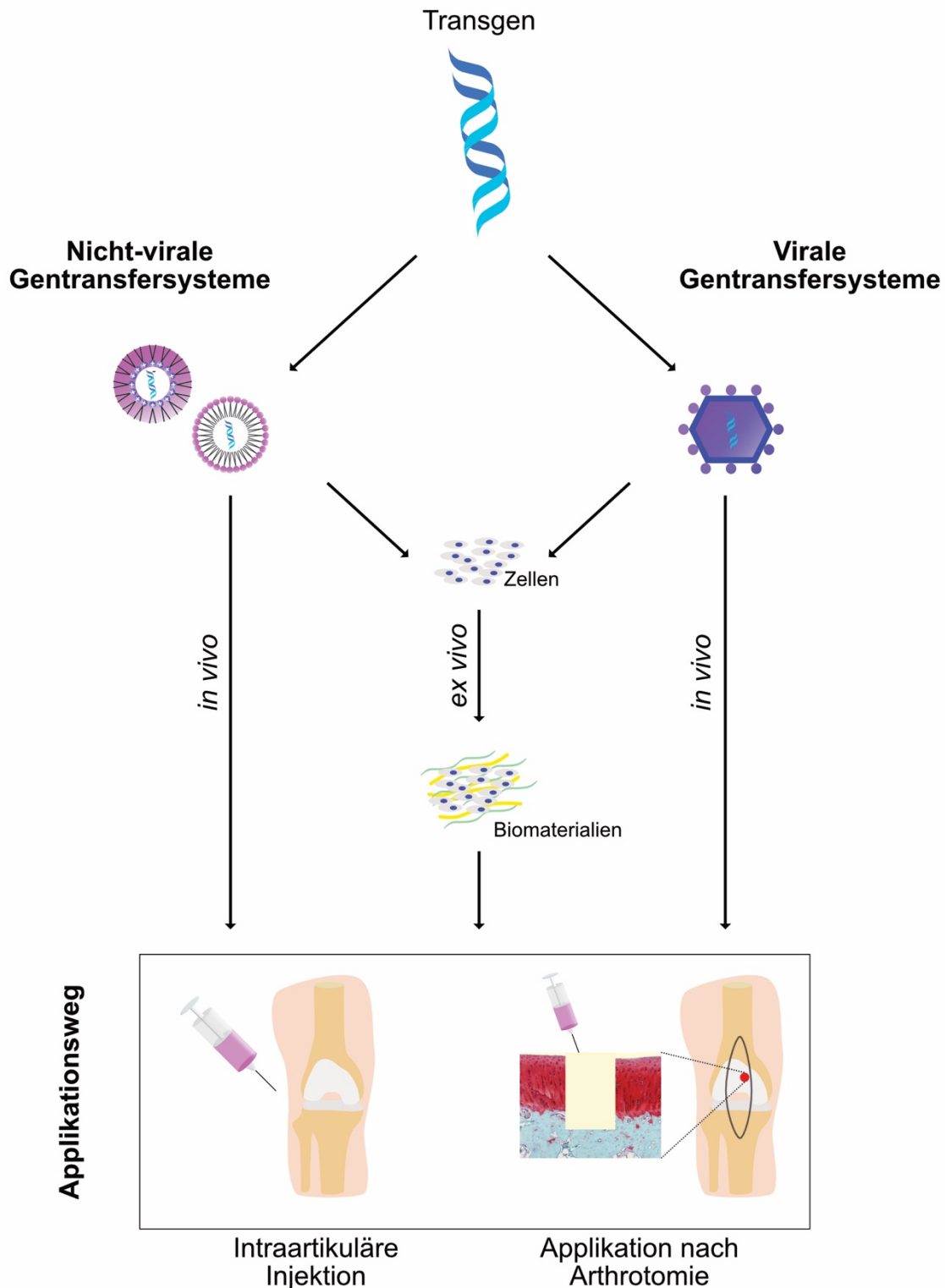


Abbildung 3: Überblick über Methoden des Gentransfers im Gelenkknorpel. Ein Transgen kann durch nicht-virale oder virale Gentransfersysteme in Zielzellen (z.B. Chondrozyten) eingebracht werden. Im *ex vivo*-Verfahren werden transgene Zellen mit Hilfe von Biomaterialien durch intraartikuläre Injektion oder nach Arthrotomie in (osteo)chondrale Defekte eingebracht. Die direkte Gabe einer therapeutischen Lösung (*in vivo*-Verfahren) ist ebenfalls über diese zwei Applikationswege möglich. Abbildung adaptiert nach Cucchiariini und Rey-Rico (2017) [50].

2.6.2 Therapeutische Faktoren

Die Knorpelreparatur weist Ähnlichkeiten mit der embryonalen Chondrogenese auf [39]. Ziel der Gentherapie ist die Überexpression therapeutischer Faktoren zur Erhöhung der Produktion an Proteinen, welche die Knorpelreparatur fördern. Dazu zählen Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, anti-inflammatorische Zytokine, Signalproteine, Proteine der extrazellulären Matrix und Rezeptoren [13]. Wachstumsfaktoren sind in der Lage, die Chondrogenese zu induzieren und modulierend in die Zellproliferation einzugreifen [253]. Sie sind meist aus Polypeptiden aufgebaut, welche durch ihre kurze pharmakologische Halbwertszeit die therapeutische Wirksamkeit vermindern [224]. Ihre Wirkung wird über spezifische, membrangebundene Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse vermittelt [70,143]. Zur Gruppe der Wachstumsfaktoren, welche die Chondrogenese fördern, gehören Mitglieder der TGF- β -Gruppe wie TGF- β 1 und - β 2 [96], BMP-2 [235] und BMP-7 [8]. Auch Mitglieder der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wie FGF-2 [119] sowie der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (GDF-5) [109] gehören dazu. BMP stimulieren jedoch auch die enchondrale Ossifikation und führen zu einer Hypertrophie von Chondrozyten. Die Zellproliferation wird durch FGF-2 [251] und durch insulinartigen Wachstumsfaktor I (IGF-I) [252] angeregt. IGF-I [250], BMP-2 und -7 [60] regen die Matrixsynthese an. Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Mitglieder der SOX-Familie können die Expression von Genen, die in die Chondrogenese involviert sind, direkt modulieren. Sie kodieren für Typ-II-Kollagen- oder Aggrekan-Gene [19,158]. Es existieren aber auch Strategien, welche degenerative Vorgänge im Reparaturgewebe inhibieren sollen. Hier sind Mitglieder der Interleukin 1- (IL-1) [87], Interleukin 17- (IL-17) [237] und Tumornekrosefaktor-Familien [216,245] mögliche Kandidaten.

2.6.3 Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2)

Das humane Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2)- Protein hat eine Größe von 18 kDA. Es besitzt eine kurze Plasmahalbwertszeit und ist bereits einige Minuten nach direkter Applikation in ein Gelenk vollständig abgebaut [239]. In tierexperimentellen, gentransferbasierten Studien zeigten sich positive Effekte auf die Knorpeldefektreparatur [40,105,123,272,274]. FGF-2 unterstützt dabei hauptsächlich die Differenzierung zu Chondrozyten *in vivo* [72,122,234], was zur Steigerung der Synthese von Matrixproteinen führt [75]. Außerdem wirkt der Faktor mitogen auf Chondrozyten [152,228] und stimuliert die Expression anderer chondrogener Faktoren wie beispielsweise SOX9 [189] oder die Freisetzung entsprechender Rezeptoren [102].

In vitro- Experimente zeigten außerdem eine reduzierte Expression von Typ-I- und Typ-X-Kollagen, welche als Marker für fibrokartilaginäres Reparaturgewebe gelten, sowie eine reduzierte Mineralisation und Expression osteogenetischer Marker wie beispielsweise alkalische Phosphatase [44]. Gegensätzliche Einflüsse auf die Knorpelhomöostase beobachtete man in Studien mit verschiedenen Spezies [59]. Dabei spielt die Regulation von FGF-2-spezifischen Rezeptoren eine Rolle, die entweder katabolische oder anabolische Prozesse induzieren [59]. Die chondroprotektive, anabole Wirkung von FGF-2 unterscheidet sich in verschiedenen Spezies [139] und ist altersabhängig [271]. Dies muss bei der Wahl des Tiermodells unbedingt beachtet werden.

2.6.4 Applikationswege

Grundsätzlich stehen zwei Wege zur Verfügung, um Transgene in Defekte einzubringen und damit die Zielzellen zu behandeln (Abbildung 3). Bei der indirekten (*ex vivo*) Methode müssen autogene, allogene oder xenogene Zellen zunächst isoliert, kultiviert und modifiziert werden. Anschließend folgt die Reimplantation, häufig in Verbindung mit Trägermaterialien [220]. J. M. Mason und Kollegen brachten retroviral-vermittelt den Knochenwachstumsfaktor BMP-7 erfolgreich mit Hilfe periostaler Zellen in einen fokalen Defekt ein [173]. Weitere Studien mit verschiedenen Wachstumsfaktoren waren ebenfalls erfolgreich [93,153]. Kaul und Mitarbeiter transfizierten FGF-2 in Chondrozyten und beobachteten nach Reimplantation der Zellen in Alginatsphäroiden eine Verbesserung der Knorpelreparatur [123]. Der direkte (*in vivo*) Transfer therapeutischer Gene in Knorpeldefekte stellte lange Zeit ein Problem dar. Vermutlich bedingt durch die dichte Knorpelmatrix, in der die Chondrozyten eingebettet sind, gelang durch adenovirale, retrovirale oder nicht-virale Genvektoren keine direkte Transgenübertragung [154]. Verbesserte Gentransfermethoden, basierend auf adeno-assoziierten Viren, zeigten jedoch Erfolge in der direkten Vektorverabreichung in einen Knorpeldefekt [40,65,150]. Die Transgen-Expression konnte auch in Chondrozyten des normalen Knorpel und in Zellen der Synovialmembran nachgewiesen werden, was auf eine Diffusion der Faktoren aus dem Defekt hinweist [40,151,215,254]. Zur erfolgreichen, direkten Applikation muss entweder ein chirurgischer Zugangsweg mittels Arthrotomie geschaffen werden oder es erfolgt eine intraartikuläre Injektion [43,65]. Die direkte, intraartikuläre Injektion findet eher Verwendung in Therapiestrategien für rheumatoide Arthritis oder Arthrose [63,154,262].

2.6.5 Gentransfersysteme

2.6.5.1 Nicht-virale Gentransfermethoden

Bei nicht-viralen Gentransfermethoden dient häufig ein Plasmid als Expressionsvektor. Die Expressionsvektoren können mit verschiedenen chemischen oder physikalischen Methoden in die Zielzellen eingeschleust werden. Die Elektroporation ist ein Beispiel für eine physikalische Gentransfermethode. Dabei wird ein elektrisches Feld genutzt, um Poren der Zellmembran zu öffnen und kleine DNS-Moleküle in die Zelle zu schleusen [194]. Chemische Methoden, wie beispielsweise lipid-basierte Gentransfersysteme [81,123,150] sind zahlreich verfügbar. Die negative Oberflächenspannung der DNS geht dabei einen Komplex mit den kationischen Liposomen ein. Bei der Transfektion mit Hilfe nicht-viraler Systeme verbleibt das transfizierte Plasmid extrachromosomal im Zellkern und produziert dort das spezifische Genprodukt [99]. Nicht-virale Systeme induzieren in der Regel keine Immunreaktion und sind deshalb wiederholt anwendbar. Außerdem sind sie zellzyklusunabhängig, haben eine höhere Aufnahmekapazität für genetisches Material und weisen eine niedrige Toxizität auf [161]. Als nachteilig erweist sich eine geringere Transfektionseffektivität und kurze Transgenexpressionraten im Vergleich zu viralen Methoden [50,91].

2.6.5.2 Virale Gentransfermethoden

Viren können als natürliche Gentransfervehikel dienen. Eine Transgen-Kassette mit der benötigten DNS-Sequenz (engl. *gene of interest*) wird dazu zunächst mittels Klonierung in das Virusgenom eingebaut. Grundsätzlich besteht das virale Wildtyp-Genom aus Sequenzen, die für virale Proteine kodieren und *cis*-agierenden, genregulierenden Sequenzen. Eine Trennung dieser Sequenzen ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt. Mit gentechnischen Methoden kann das Virusgenom modifiziert und replikationsinkompetente, virale Vektoren hergestellt werden. Die rekombinante DNS wird nun mit viruseigenen Integrationswegen in die Zielzellen geschleust. Die häufigsten, für den sicheren Gentransfer verwendeten Viren sind Adenoviren, Retro- und Lentiviren, Herpes Simplex Viren (HSV) und adeno-assoziierte Viren (AAV) [4,50]. Adenoviren sind die häufigsten Viren, die zur Knorpelreparatur eingesetzt werden [50]. Sie besitzen eine hohe Transduktionseffizienz und können daher *in vivo* verwendet werden [13]. Eingeschränkt wird die Verwendung jedoch durch die induzierte Immunantwort des Wirtsorganismus nach viraler Erstinfektion [14,257]. Außerdem ist die zeitliche Transgenexpression reduziert [43,50]. Grund dafür ist der Verbleib des Transgens als

Episom in der Zielzelle [99]. Im Gegensatz dazu werden retro- und lentivirale Vektoren in das Genom der Zielzelle integriert. Das Transgen wird dadurch repliziert und die zeitliche Transgenexpression ist erhöht [64]. Retrovirale Vektoren transduzieren jedoch keine ruhenden Zellen. *In vivo* weist der Gentransfer daher keine hohe Effizienz auf [21,158]. Herpesviren sind effektive Vektoren, jedoch ist ihre Verwendung durch eine hohe Toxizität limitiert [50,64]. Eine zweite Generation an HSV-Vektoren kann diesen Nachteil verbessern [270]. Bis heute gelten rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) als vielversprechendste Vektoren für die Gentherapie [13]. Ihre Verwendung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und Arthrose wird bereits in ersten klinischen Studien erprobt [66].

2.6.5.3 Adeno-assoziierte virale Vektoren

Grundlage der in dieser Studie verwendeten Vektoren sind adeno-assoziierte Viren (AAV), welche zur Gattung der Dependoparvoviren gehören. Die Virionen besitzen einen Durchmesser von 20-25 nm, sind in ikosaedrischer Form angeordnet und beinhalten ein eingekapseltes, 4,7 kb großes, einzelsträngiges DNS-Genom [263] (Abbildung 4). Als Wild-Typ sind sie auf Helferviren, häufig aus der Familie der Adenoviren, als Helferviren angewiesen. Das Ausbleiben einer Co-Infektion durch Helferviren verhindert die produktive Replikation von Viruspartikeln. Die Integration innerhalb der Wirtszelle ist dennoch möglich [263]. AAV sind im Tierreich und beim Menschen weit verbreitet. Man geht davon aus, dass bis zu ca. 80% der humanen Population Antikörper gegen AAV-Serotypen besitzen [22,115]. Es existieren 5 Serotypen von adeno-assoziierten Viren, von denen AAV-2 bereits früh sequenziert und charakterisiert werden konnte [147,244,263]. Umschlossen wird das AAV-Genom von haarnadelförmig angeordneten sog. *Inverted Terminal Repeats* (ITRs) [147]. Weitere essenzielle Bestandteile des Genoms sind *rep*- und *cap*-Sequenzen. Die *rep*-Gene sind für die Replikation notwendig und kodieren 4 Proteine (*Rep* 68, 78, 52, 40). Das Kapsid wird durch Strukturproteine gebildet, welche durch *cap*-Gene kodiert werden (VP 1, 2 3) [225]. Als Promotor-Sequenzen dienen p5 und p19 sowie p40 [263]. Der natürliche Lebenszyklus von AAV ist komplex. In Abwesenheit eines Helfervirus kommt es nach Infektion der Wirtszelle zu einer Integration des AAV-Genoms in das Wirtsgenom (latente Infektion) [90]. Beim Menschen befindet sich der spezifische Locus auf dem Chromosom 19. Das AAV-Genom liegt auch häufig als extrachromosomales Episom vor [174]. Kommt es nun zu einer Co-Infektion, wird die Viruspartikelproduktion durch einen lytischen Zyklus induziert und es kommt zur Freisetzung der Partikel [90].

Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) sind weniger immunogen, da ihre *rep*- und *cap*- Sequenzen vollständig entfernt werden können [16]. An ihre Stelle tritt eine Expressionskassette, welche die Gensequenz des entsprechenden Wunschgens enthält. Die zur Replikation benötigten *rep*- und *cap*-Gene können dann beispielsweise durch ein Hilfsplasmid zur Verfügung gestellt werden. Die ITRs bleiben als viruseigene Sequenzen erhalten. rAAV-Vektoren können sowohl sich teilende- als auch ruhende Zellen mit einer sehr hohen Transduktionseffizienz (bis zu 100%) innerhalb der extrazellulären Matrix adressieren [56,220,247,259]. Die Expression der Transgene erfolgt über einen langen Zeitraum [45,151]. Eine Genotoxizität durch insertionelle Mutagenese wird in der Regel nicht beobachtet [138].

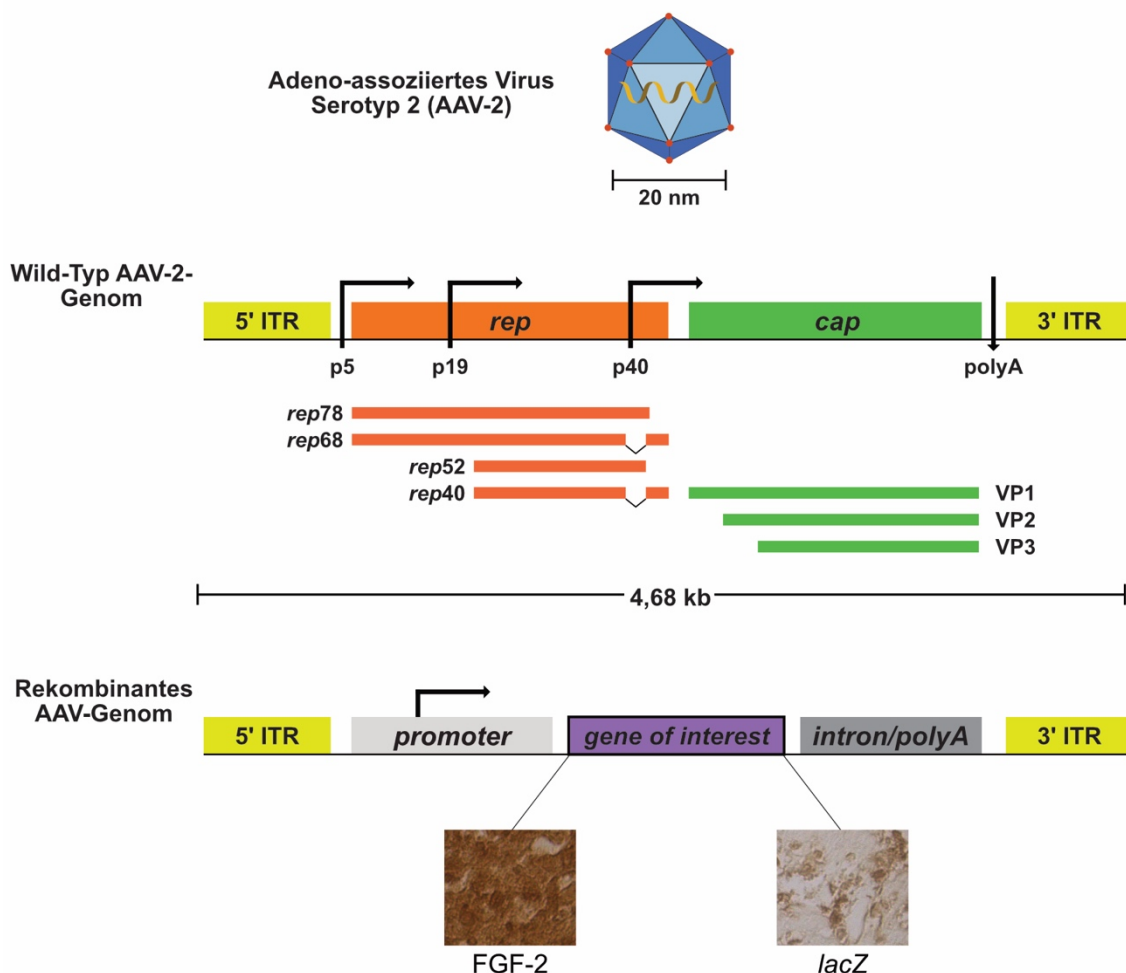


Abbildung 4: Aufbau des AAV-2 Wildtyp-Genoms sowie der rekombinanten AAV-Vektoren. *Gene of interest* beispielhaft für hFGF-2 und *lacZ*. Abbildung adaptiert aus Cucchiari *et al.* (2015) [48].

2.7 Konzept der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Studie wurde der Ansatz der Gentherapie zur Behandlung osteochondraler Defekte verfolgt (Abbildung 5). In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass rekombinante adeno-assoziierte virale (rAAV) Vektoren Markergene in Knorpelzellen sehr gut transduzieren können und dabei die Transduktionsrate hoch effizient und anhaltend (80-90%) über einen Zeitraum von mindestens vier Monaten ohne schädliche Nebeneffekte aufrechterhalten [40,45,47,51,105].

Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2) ist ein therapeutischer Faktor, welcher reparative Eigenschaften in Chondrozyten, Knorpelgewebe und mesenchymalen Stammzellen aufweist [44,209,252]. *In vivo*-Studien am Kleintiermodell (Kaninchen) zeigten Verbesserungen der Knorpelreparatur von osteochondralen Defekten nach rAAV-Vektorapplikation und Überexpression von hFGF-2 [40,105]. Wir wählten hFGF-2 daher aus, um den katabolen Effekt der Steigerung der Chondrogenese *in vivo* zu stimulieren und verglichen den Effekt mit einer Reporter-*lacZ*-behandelten Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ*). Ein direkter, rAAV-Vektor-vermittelter *in vivo*-Gentransfer in flüssiger Lösung ohne Verwendung von Trägermaterial wurde in der vorliegenden Studie favorisiert. Die Vektorendosis wurde niedrig gewählt ($2,4 \times 10^5$ funktionale Partikel) [51].

Um diesen experimentellen Ansatz anzuwenden, wählten wir das translationale Großtiermodell des Schafes [162]. Zur Verbesserung der Knorpelreparatur und Arthrose existieren bereits einige Studien am Schafmodell [58,101,127,169,201,208]. Wir verfolgten in dieser Studie einen bilateralen Ansatz. Die Stichprobengröße berechneten wir anhand zuvor durchgeführter translationalen Studien zu Knorpeldefektmodellen [51,58,202]. Um den potenziellen Verlust von Versuchstieren zu kompensieren, wurde eine Stichprobenanzahl von 8 Tieren gewählt. Wir setzten osteochondrale Defekte auf der *Trochlea femoris* des Kniegelenks des Schafes mit einem standardisierten AO-Bohrer (3,5mm Spiralbohrer). Das Gelenk wurde über eine kleine mediale, parapatelläre Arthrotomie (Miniarthrotomie) eröffnet [200]. Nach dem Setzen der Defekte kam es zur spontanen Vermischung des Knochenmarkblutes mit der rAAV-Lösung. Durch die Penetration der subchondralen Knochenplatte eröffneten sich Blutgefäße. Dabei migrierten pluripotente, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Die mesenchymalen Stammzellen dienten als Zielzellen des in dieser Studie durchgeführten Gentransfers. Wir bewerteten die osteochondrale Reparatur anhand validierter Methoden nach einer mittelfristigen Zeitspanne von 6 Monaten und überprüften die nachfolgenden Hypothesen (siehe Kapitel 3) anhand etablierter Methoden.

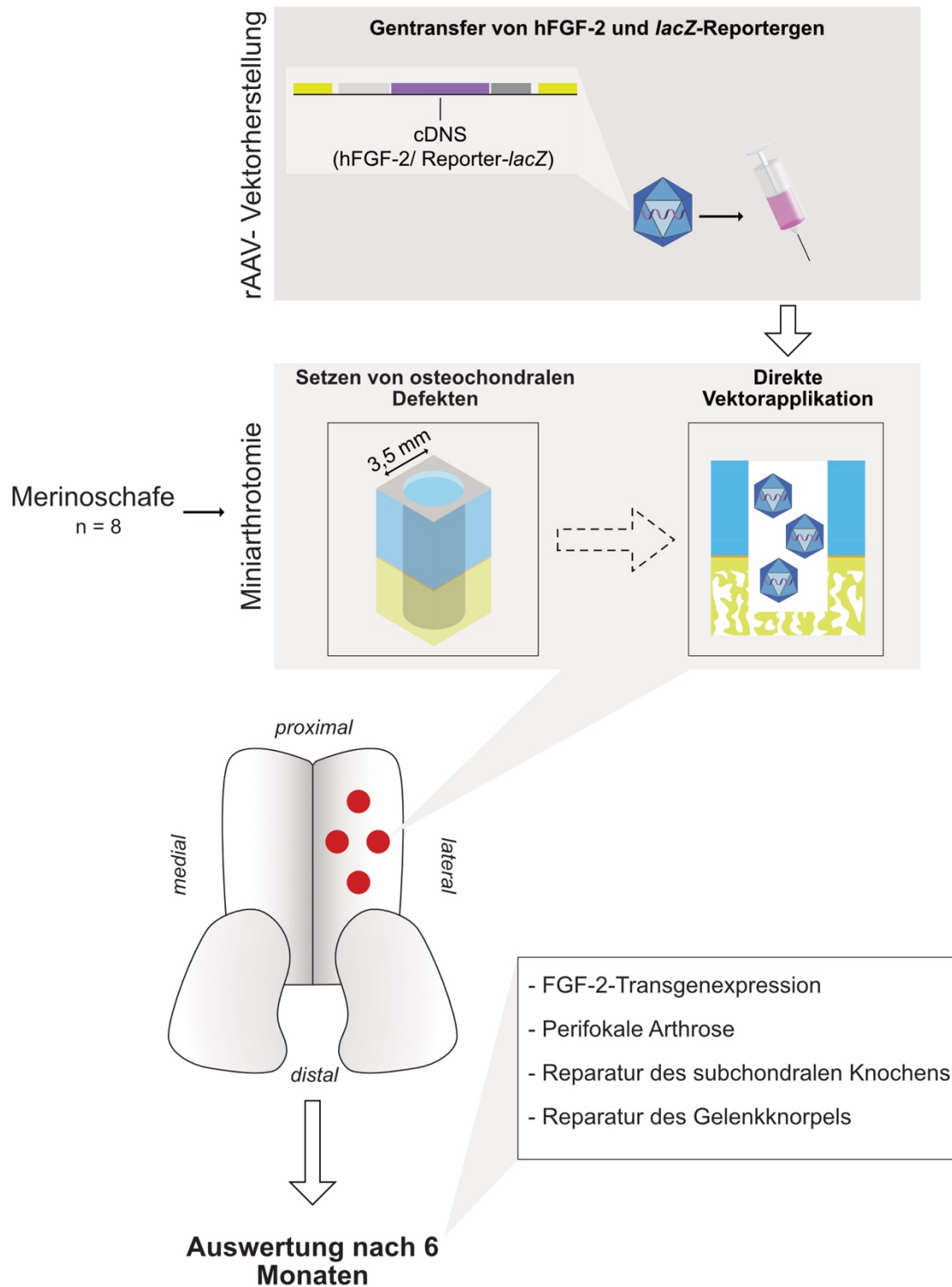


Abbildung 5: Konzept der Studie.

3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit überprüfen wir am Großtiermodell des Schafes folgende Hypothesen:

- 1) Direkter, rAAV-vermittelter Gentransfer in osteochondrale Defekte ermöglicht eine effektive Genexpression des humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (hFGF-2) für 6 Monate *in vivo*.
- 2) Durch direkten, rAAV-vermittelten Gentransfer von hFGF-2 in osteochondrale Defekte wird das Auftreten einer perifokalen Arthrose weniger beobachtet als in der *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe.
- 3) rAAV-vermittelter Gentransfer von hFGF-2 in osteochondrale Defekte verbessert die Reparatur des subchondralen Knochens *in vivo* im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe.
- 4) rAAV-vermittelter Gentransfer von hFGF-2 in osteochondrale Defekte verbessert die Reparatur des Gelenkknorpels *in vivo* im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe.

4. Materialien

4.1 Lösungen, Puffer, Medien

Die verwendeten Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt.

Lösungen	Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge/Volumen
Blockierungspuffer	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung (3'3 Diaminobenzidin)	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH=7,5)	2 Tropfen
	DAB Substratreagenz	4 Tropfen
	H ₂ O ₂	2 Tropfen
DMMB-Färbelösung (pH 3,5)	1,9-Dimethylmethylenblau	16 mg
	Natriumhydroxid (1 M)	25,6 ml
	Ethanol (95%)	5 ml
	Ameisensäure (90%)	3 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
DMMB-Lösung A	D-Cysteinhydrochlorid-monohydrat	0,05 g
	PBE	30 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	0,053 g
	Lösung A	1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung A	24,95 ml
	Lösung C	0,05 ml
Echtgrün-Lösung	Echtgrün	200 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entkalkungs-Lösung	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90%)	250 ml
	H ₂ O	ad 750 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Hämatoxylin-Lösung nach Harris	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100%)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	PBS	ad 40 ml
PBS	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM

	Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 mM
Safranin O Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H_2O	ad 1000 ml
Salzsäure-Lösung	HCl (37%)	5,4 ml
	H_2O	ad 200 ml
TNE-Puffer	NaCl	5,8 g (100 mM)
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372 mg (1 mM)
	Tris/(HCL) (pH 7,4)	1322 mg (10 mM)
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 ml
	PBS	25% (V/V)
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3%)	H_2O_2	0,6 ml
	H_2O	200 ml

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien

4.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet. Weitere Chemikalien und Bezugsquellen:

Chemikalie	Hersteller
ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase)- Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Ameisensäure	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
BCA Protein Assay (Reagent B)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Caprofol	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Dimethylmethylenblau	Serva (Darmstadt, Deutschland)
Echtgrün (FCF)	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (100%)	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin (A+B)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin (nach Weigert/nach Harris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)

Isopropanolol	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Papain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Albrecht GmbH (Aulendorf, Deutschland)
Pierce-BCA-Protein-Assay (Reagent A)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Propofol	AstraZeneca (Wedel, Deutschland)
Rompun (Xylazin-Hydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Roti Histokit II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin O	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Standard-DNS-Lösung (10µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Typ-I-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Typ-II-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Waschpuffer-Konzentrat (10x)	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylazin	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Xylen	Apotheke UKS (Homburg, Deutschland)
Xylol	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)

Tabelle 2: Chemikalien

4.3 Zelllinien und Zellen

Für die Herstellung von viralen Vektoren kamen humane embryonale Nierenzellen der 293-Zelllinie zur Anwendung (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland).

4.4 Antikörper und Enzyme

Wir verwendeten für die immunhistologischen Färbungen folgende Antikörper:

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-Typ-I-Kollagen (AF-5610)	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen (AF-5710)	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-FGF-2 (C-18)	Maus	Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 3: Antikörper

Entnommenes Knorpelmaterial wurde mittels Papain (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verdaut. Bei immunhistochemischen Färbungen wurde Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

4.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zusätzlich zu allgemeinen Laborgeräten wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (Mikroskop)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Eindeckgläser	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Fettstift Liquidblocker	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa, Italien)
GENios Mikroplattenleser	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlplatte EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Magnetrührer RH Basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Röntgenröhre (μ CT)	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)
Scanner (μ CT)	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CK-2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, F-Profil)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mischplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
OptiPlate-96 Schwarz	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Paraffin-Granulat Paraplast X-tra	Leica (Nussloch, Deutschland)
Paraffinausgießstation EG 1140-H	Leica (Nussloch, Deutschland)
Plattenabdeckung	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Plattenschüttler LabNet Orbit LS	Labnet (Woodbridge, NJ, USA)
Reprostativ mit Reproarm RTX	Kaiser Fototechnik (Buche, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
SuperFrost/Plus Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Tischzentrifuge Qualitron Mikrozentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Vortex Reagenzglas mischer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 37°C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI 1210	Leica (Nussloch, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen Falcon	Fisher Scientific (Toronto, Kanada)

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.6 Computerprogramme

<i>Programm</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Affinity Designer	Illustrationen, Abbildungen	Serif (Nottingham, Großbritannien)
Affinity Photo	Bildbearbeitung	Serif (Nottingham, Großbritannien)
analySIS	Auswertung digitaler Bilder	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
cellSens Standard	Auswertung digitaler Bilder	Olympus (Hamburg, Deutschland)
CT-Analyzer	Auswertung der Mikro-CT Daten	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
CT-Vol	3D-Rekonstruktion der Mikro-CT Bilder	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
CT-Vox	Volumenrendering Software	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
DataViewer	Betrachten der Mikro-CT Bilder	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
GraphPad PRISM 8	Statistische Analysen und Datenvisualisierung	GraphPad Software, (San Diego, CA, USA)
IBM SPSS Statistics 25	Statistische Analysen	IBM Corporation (Armonk, NY, USA)
NRecon	Rekonstruktion der Mikro-CT Bilder	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
Stata software (release 15)	Statistische Analysen	Stata Corp. (College Station, TX, USA)

Tabelle 5: Computerprogramme

4.7 Operationsinstrumentarium- und materialien

Nahtmaterialien, Nadeln und Spritzen wurden von den Firmen Braun (Melsungen, Deutschland) und Ethicon (Somerville, MA, USA) bezogen. Weitere chirurgische Instrumente und sterile Abdeckungstücher stammen von den Firmen Martin und Medicon (beide Tuttlingen, Deutschland), A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz) und Megro (Wesel, Deutschland). Subchondrale Bohrlöcher setzten wir mit einem 3,5 mm Spiralbohrer der Firma Synthes (Umkirchen, Deutschland). Nahtmaterialien, Nadeln und Spritzen wurden von den Firmen Braun (Melsungen, Deutschland) und Ethicon (Somerville, MA, USA) bezogen. Weitere chirurgische Instrumente und sterile Abdeckungstücher stammen von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz) und Megro (Wesel, Deutschland).

5. Methoden

5.1 Überblick

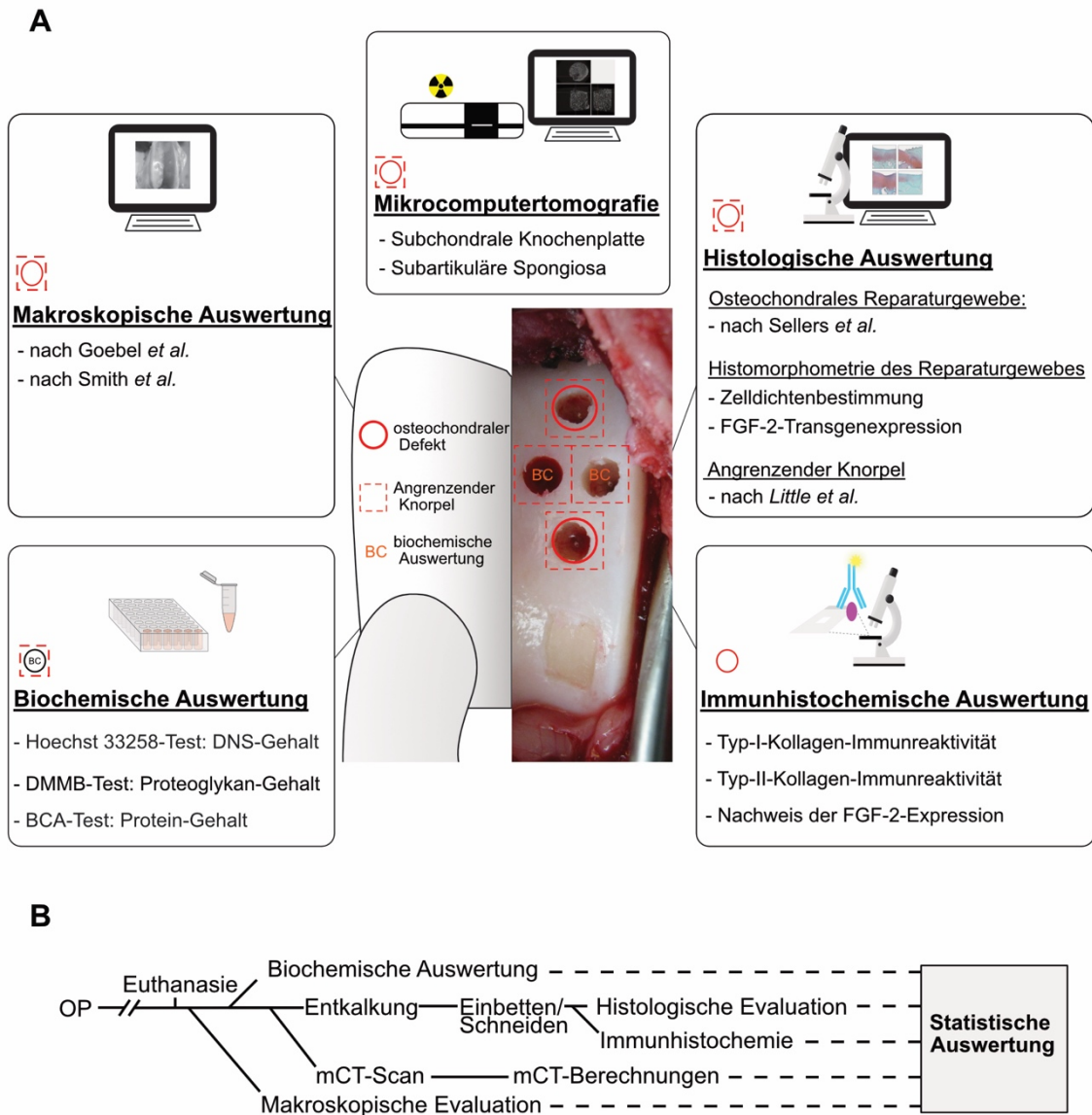


Abbildung 6: Überblick über die angewandten Methoden. Evaluation der osteochondralen Reparatur anhand bildgebender Verfahren und durch histologische, immunhistochemische sowie biochemische Verfahren (A). Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Durchführung (B).

5.2 Herstellung rekombinanter adeno-assoziiierter viraler Vektoren

Die rAAV-Vektoren der hier durchgeführten Studie wurden von Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Cucchiariini und Herrn Dr. rer. nat. J. Venkatesan entworfen, hergestellt und transduziert. Als ersten Schritt der komplexen rAAV-Vektorkonstruktion wurde das entsprechende rekombinante AAV-Plasmid durch Klonierung hergestellt. Die gewünschte komplementäre DNS (cDNS) wurde in Plasmide kloniert, in Bakterien transformiert und vervielfältigt sowie anschließend isoliert. Danach erfolgte die Transfektion von Wirtszellen mit entsprechenden rekombinanten AAV-Plasmiden. Als Produkt entstanden rekombinante, adeno-assoziierte virale Vektoren mit unterschiedlicher Plasmid-DNS (Reporter-*lacZ*, hFGF-2), welche wir in osteochondrale Defekte applizierten (Abbildung 7).

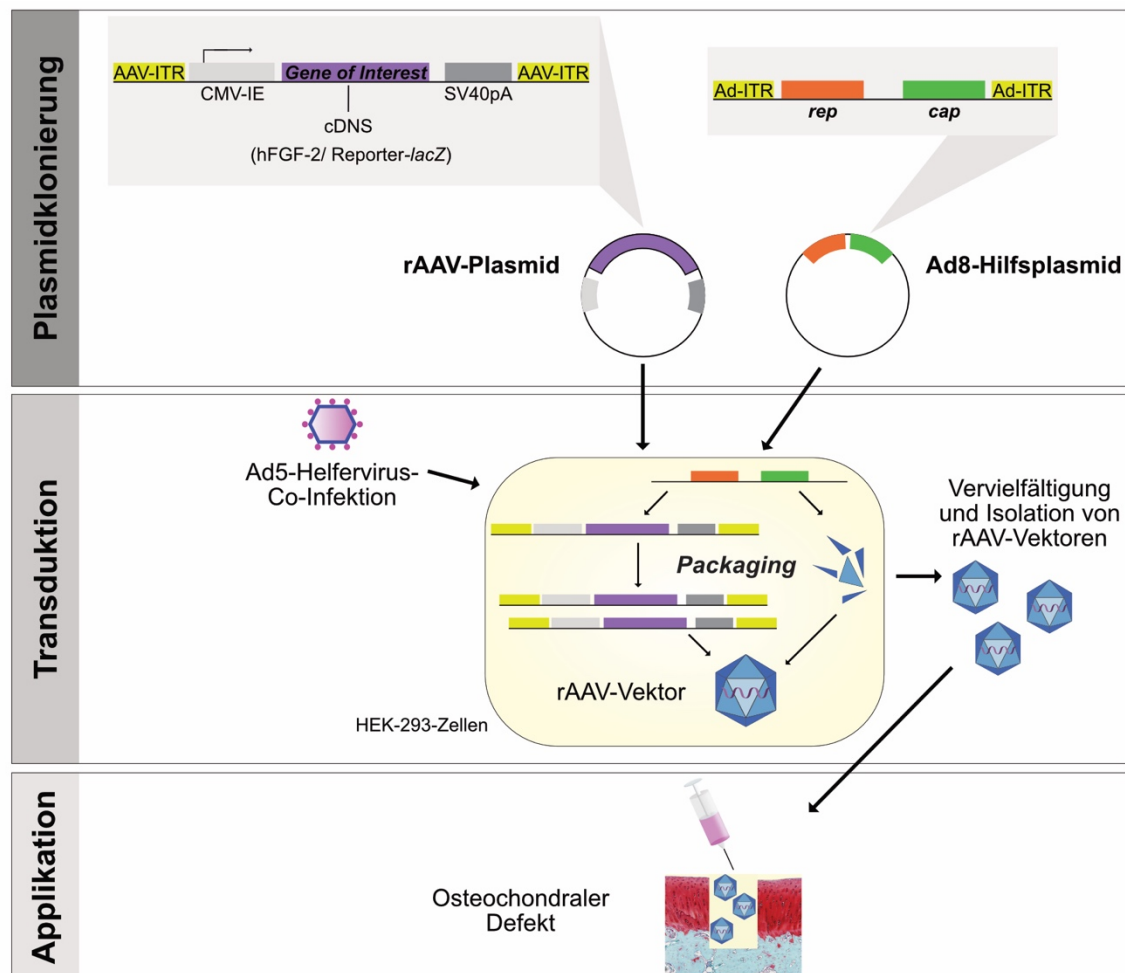


Abbildung 7: Schematische Darstellung der rAAV-Vektorherstellung. Nach Amplifikation der Plasmid-DNS wird das rekombinant hergestellte rAAV-Plasmid mit dem jeweiligen *gene of interest* mit Hilfe von Ad8-Hilfsplasmid und Ad5-Helfervirus in HEK-293-Zellen geschleust, vervielfältigt und isoliert (Transduktion). Anschließend erfolgt die direkte Applikation in einen osteochondralen Defekt.

5.2.1 Plasmiddesign und Amplifikation der Plasmid-DNS

Die Herstellung von rAAV-Vektoren erfolgte aus dem rekombinanten AAV-2 genomischen Klon Plasmid pSSV9 [229,230]. Ausgehend von pSSV9 wurden zwei Basisplasmide, rAAV-Plasmid (mit variabler Klonierungsstelle) und Ad8 Hilfsplasmid konstruiert. Ad8 trug die AAV-Gene für die Replikation (*rep*) und Capsidbildung (*cap*). Alle Plasmide standen unter Kontrolle des heterologen *Promotor/Enhancer* CMV-IE (*Cytomegalievirus Immediate Early*) sowie dem SV40 (*simian virus 40*) Polyadenylierungssignals. Sie besaßen als Selektionsmarker das β -Lactamase-Gen Amp^R. An die variable Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site, MCS*) des rAAV-Plasmids konnte nun die Integration der gewünschten cDNS-Sequenz mittels Subklonierung erfolgen. In der vorliegenden Studie trug das rAAV-*lacZ*-Plasmid das Reporter-Gen *lacZ* (ca. 3,5 kB), welches für β -Galaktosidase kodiert und als Kontrollbehandlung diente. rAAV-hFGF-2 trug die cDNS des humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (480 bp) [236] und wurde anstelle des *lacZ*-Gens kloniert [40]. Die Amplifikation der Plasmid-DNS erfolgte nach Transformation in Bakterien (*Escherichia coli* DH 5 α ; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und anschließender Isolierung aus der Bakterienkultur (Genopure Plasmid Maxi Kit, Roche Applied Sciences, Penzberg, Deutschland).

5.2.2 Transduktion

Die Transduktion der rekombinanten AAV-Plasmide mit entsprechender *Gene of Interest* (GOI)-Sequenz erfolgte in Wirtszellen (*packaging*). In der vorliegenden Arbeit dienten humane, embryonale Nierenzellen der 293-Zelllinie (HEK-293) als Wirtszellen. Diese wurden mit einem adenoviralen Helfervirus (Ad5) infiziert, welcher nach Zugabe von Ad8-Hilfsplasmid dessen Proteinbiosynthese der *rep*- und *cap*- Proteine aktivierte. In Kombination mit der Bildung der Kapsidbestandteile des Vektors wurde die Replikation der rAAV-DNS mit enthaltener GOI-Sequenz induziert. Anschließend wurde die Freisetzung der vollständigen, rekombinanten Vektoren eingeleitet. Die gebildeten Vektoren wurden anschließend durch Dialyse gereinigt und mittels *real-time* Polymerasekettenreaktion (*RT-PCR*) titriert (10^{10} Transgen-Kopien pro Milliliter). Das Verhältnis von viralen Partikeln zu funktionellen Vektoren betrug 500 zu 1 [40,44,51].

5.3 Großtiermodell

Erwachsene und gesunde, weibliche Merinoschafe ($n = 8$; durchschnittliches Körpergewicht $77,1 \pm 4,4$ kg; Alter 34 ± 8 Monate;) mit geschlossenen Wachstumsfugen bezogen wir vom Landesschafzuchtverband Sachsen-Anhalt e.V. (Halle, Deutschland). Sie erhielten Wasser *ad libitum* sowie eine Ernährung nach einer standardisierten Diät. Die tierexperimentellen Versuche führten wir nach Genehmigung der saarländischen Tierschutz-Kommission (gemäß §8 des Tierschutzgesetzes, Versuchsnummer 19/2011) und in Übereinstimmung mit dem nationalen Recht für Tierschutz sowie nach gültigen NIH-Richtlinien für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren („*guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition*“; durch [38]. Eine tierärztliche Begutachtung fand regelmäßig statt.

5.4 Operationsverfahren

5.4.1 Präoperative Versorgung und Anästhesie

Die Sedierung mit 2% Rompun wurde nach zwölfstündiger Fastenzeit durchgeführt. Die endotracheale Intubation erfolgte nach intravenöser Verabreichung von 2% Propofol (20 ml/kg Körpergewicht) und Caprofen (1,4 mg/kg Körpergewicht). Die Narkose wurde mit 1,5% Isofluran *per inhalationem* in wechselnder Dosierung sowie intravenöser Gabe von Propofol (6-20 mg/kg Körpergewicht/h) aufrechterhalten. Perioperativ wurde Caprofen (1,4mg/kg Körpergewicht) zur Analgesie sowie eine Antibiotikaphylaxe (Penicillin/Streptomycin; 3 ml/50 kg) intravenös verabreicht.

5.4.2 Operative Vorgehensweise

Die Operationen der Versuchstiere führte Herr Prof. Dr. med. H. Madry unter Assistenz von Herrn Prof. Dr. med. P. Orth und Herrn Y. Morscheid am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) durch. Herr Prof. Dr. med. M. Laschke leitete die Intubationsnarkosen der Tiere ein, hielt die Allgemeinanästhesien aufrecht und betreute die Narkoseausleitungen.

Nach Rückenlagerung, Rasur des OP-Gebietes, sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgte der Zugang zum Kniegelenk per modifiziertem medialen parapatellarem Hautschnitt durch eine Miniarthrothomie [200]. Das Bein des Tieres wurde dabei durch einen Assistenten in Extensionsstellung gehalten. Der Hautschnitt verlief 1 cm medial

des distalen Patellapols bis 1 cm proximal der *Tuberositas tibiae* auf einer Länge von insgesamt ca. 5 cm. Nach subkutaner Präparation wurde die Gelenkkapsel mit einem Elektrokauter unter begleitender, sukzessiver Blutstillung, eröffnet. Der *Musculus vastus medialis obliquus* wurde bei der Schnittführung geschont. Die Patella wurde mit einem kleinen Hohmann-Hebel leicht nach lateral subluxiert, sodass die *Trochlea femoris* des Schafes in 20° Knieflexion dargestellt werden konnte. Mit einem AO-Spiralbohrer mit einem Durchmesser von 3,5 mm wurde ein 5 mm tiefer Defekt gesetzt. Die Defektkreierung erfolgte rautenförmig auf der *Trochlea femoris lateralis* nach der jeweiligen Gruppenzuordnung. Wir injizierten jeweils 10 µl rAAV-Lösung in die gesetzten Defekte und operierten stets beide Kniegelenke. Ein Kniegelenk erhielt den Wachstumsfaktor hFGF-2 (hFGF-2-behandelte Defekte), die Gegenseite diente als Kontrollgruppe (*lacZ*-behandelte Defekte). Die Zuordnung erfolgte alternierend. Wir setzten pro Kniegelenk jeweils vier osteochondrale Defekte und unterschieden zwischen Defekten der proximalen *Trochlea femoris lateralis* (PTL) und distalen *Trochlea femoris lateralis* (DTL) (Abbildung 8). Die Kapsel wurde mit geflochtenen Fäden der Stärke 3 USP verschlossen. Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluss sowie die Hautnaht in Einzelknopf-Technik mit Vicryl-Fäden der Stärke 2 USP. Die Wunde deckten wir mit einem aluminiumhaltigen Sprühverband ab (Abbildung 8).

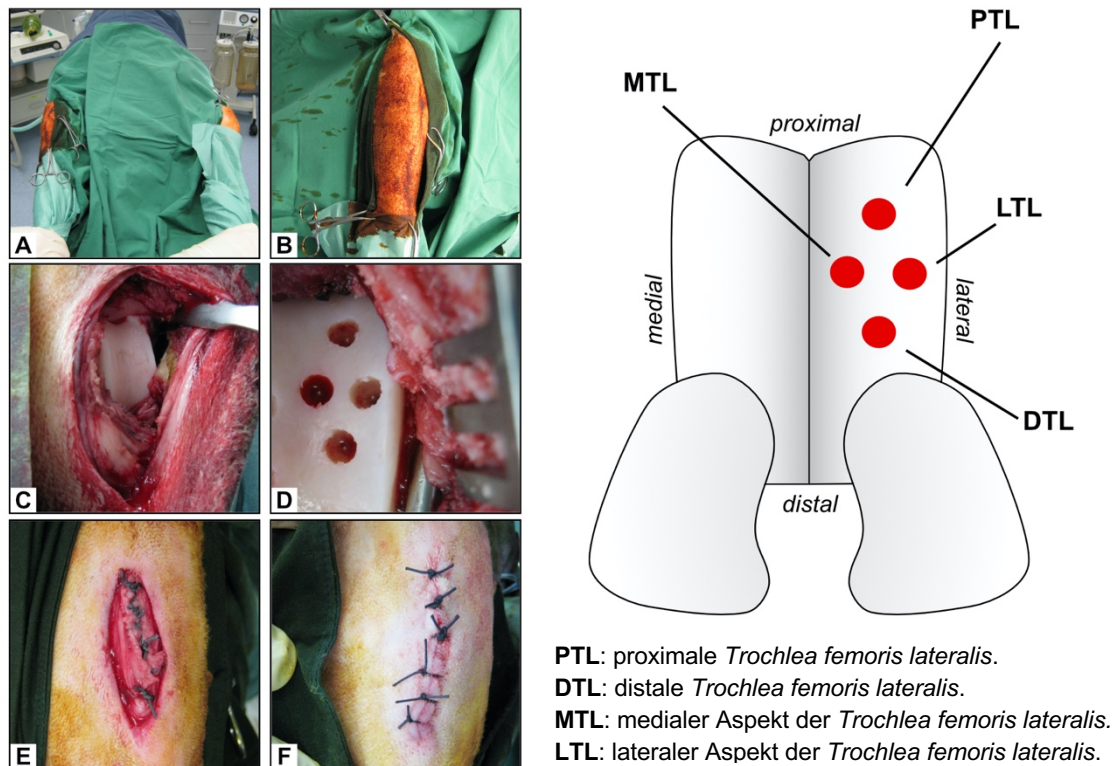


Abbildung 8: Operative Vorgehensweise. Nach Rückenlagerung (A), steriler Abwaschung und Abdeckung (B) konnte nach chirurgischer Präparation die *Trochlea femoris* dargestellt werden (C). Osteochondrale Defekte wurden mit einem 3,5mm AO-Bohrer gesetzt und rAAV-Lösung direkt appliziert (D). Schichtweiser Wundverschluss (E). Vicryl-Einzelknopfnahte zum Hautverschluss (F).

5.4.3 Postoperative Versorgung

Die Tiere erhielten eine postoperative Antibiotikaphylaxe mit Penicillin/Streptomycin (3ml/ 50kg Körpergewicht). Zur postoperativen Analgesie erhielt jedes Tier 3ml Fenpipramid/Levomethadon 0,25% (MSD, Unterschleißheim, Deutschland) sowie Caprofen (1,8 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert. Die Standzeit der Schafe betrug insgesamt sechs Monate. Eine engmaschige klinische Verlaufskontrolle nach einem standardisierten Protokoll erfolgte für 10 Tage *post operationem*. Dabei wurde auf die Belastung der operierten Extremitäten, sichtbare Zeichen der Entzündung und Anzeichen von Schmerzen geachtet. Die Schmerzmedikation wurde stetig angepasst. Die Fütterung und Versorgung der Tiere erfolgte artgerecht nach fest angegebenen Mahlzeiten. Die Tiere wurde bis 14 Tage *post operationem* täglich visitiert und untersucht. Der Transport in den Haltungsbetrieb konnte anschließend ohne Anzeichen von Lahmheit oder sonstigen Beeinträchtigungen stattfinden.

5.5 Sektion

Die Euthanasie erfolgte nach einer Standzeit von insgesamt 6 Monaten nach Narkoseeinleitung in artgerechter Weise. Die Kniegelenke der Tiere wurden *in toto* entnommen und vom Weichteilmantel befreit. Wir untersuchten die Kniegelenke auf Infektions- oder Entzündungszeichen und fotografierten die operierten Areale für die makroskopische Auswertung unter standardisierten Bedingungen hochauflösend im Nahfokus-Modus. Anschließend entnahmen wir aus den lateralen und medialen Defekten (LTL, MTL) sowie von dem angrenzenden Gelenkknorpel Proben für die biochemische Auswertung mit einem scharfen Löffel, sammelten sie in Gefäßen und fixierten sie auf Trockeneis (-80°C). Die für die Auswertung verwendeten femoralen Anteile der Kniegelenke wurden verwechslungsfrei gekennzeichnet, in Formalin- (4%) gefüllten Behältern fixiert und gelagert. Bei einem Tier konnte man nach Eröffnung des Kniegelenkes eine Destruktion des Gelenkes mit Zeichen einer Entzündung feststellen (Ergussbildung, Synovialitis). Dieses Tier wurde von den weiteren Analysen ausgeschlossen (Anzahl der analysierten Versuchstiere n = 7).

5.6 Makroskopische Evaluation

Nach der Sektion wurden alle Defektareale der Kniegelenke unter standardisierten Bedingungen hochauflösend, digital fotografiert (10 Megapixel, Canon PowerShot A480) und anhand der nachfolgenden Bewertungssysteme evaluiert.

5.6.1 Bewertungssystem nach Goebel et al.

Verblindet wurden die einzelnen Defekte anhand des inversen, semiquantitativen Bewertungssystems nach Goebel *et al.* [85] (Tabelle 6, max. 20 Punkte: fehlende Knorpelreparatur, min. 0 Punkte: komplette Knorpelreparatur) evaluiert.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	Hyalin oder weiß	0
	vorwiegend weiß (>50%)	1
	vorwiegend transparent (>50%)	2
	transparent	3
	kein Reparaturgewebe vorhanden	4
2. Sichtbare Blutgefäße im Reparaturgewebe	keine sichtbaren Blutgefäße	0
	<25% des Reparaturgewebes	1
	25-50% des Reparaturgewebes	2
	50-75% des Reparaturgewebes	3
	>75% des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächen- beschaffenheit des Reparaturgewebes	glatt, homogen	0
	glatt, inhomogen	1
	Fibrillationen	2
	inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	im Niveau	0
	>50% der Defekttiefe ausgefüllt oder hervorstehend	1
	<50% der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0% der Defekttiefe ausgefüllt	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4
5. Degeneration des angrenzenden Knorpels	normal	0
	Risse und/oder Fibrillationen in der Integrationszone	1
	diffuse arthrotische Veränderungen	2
	Ausbreitung des Defekts in den angrenzenden Knorpel	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4

Tabelle 6: Makroskopisches Bewertungssystem (nach Goebel *et al.*) [85].

5.6.2 Bewertungssystem nach Smith et al.

Zur Beurteilung der makroskopischen Knorpelreparatur verwendeten wir das Bewertungssystem des modifizierten *Oswestry Arthroscopy Score* nach Smith *et al.* (OAS, Tabelle 7, max. 8 Punkte: gute Knorpelreparatur, min. 0 Punkte: schlechte Knorpelreparatur) [241].

<i>Kategorie</i>	<i>Parameter</i>	<i>Punkte</i>
1. Defektniveau im Vergleich zu umgebendem Knorpelgewebe	gleiches Niveau	2
	höheres Niveau	1
	niedrigeres Niveau	0
2. Integration in umgebendes Knorpelgewebe	komplett	2
	kleine Unterbrechung (<25% des Areal)	1
	große Unterbrechung (>25% des Areal)	0
3. Oberflächenbeschaffenheit	glatt	2
	feine Ausziehungen	1
	größere Ausziehungen/Fibrillationen	0
4. Farbe des Defekts	perlweiß, hyalines weiß	2
	weiß	1
	gelb	0

Tabelle 7: Makroskopisches Bewertungssystem (nach Smith *et al.*) [241].

5.7 Histologische Auswertung

5.7.1 Entkalkung

Für die histologische Auswertung benötigte Proben wurden zunächst in 70%-igem Ethanol gelagert. Nach Durchführung der Mikro-CT-Bildgebung (Kapitel 5.9) wurden die Proben mit einem Skalpell geteilt und in ein Entkalkermmedium überführt. Das Medium wechselten wir regelmäßig. Die Proben betteten wir anschließend nach 2 Monaten Entkalkung in Paraffin ein.

5.7.2 Fixierung und Einbettung

Für die Paraffin-Fixierung war eine vorbereitende Entwässerung der Proben notwendig. Dazu wurden sie zunächst mit *aqua bidest* gewaschen (2x 1 h und 1x ü.N.) und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 2x 95%, 1x 100%, jeweils 1 h und 100% ü.N. und 1 h 100%) dehydriert. Nach Lagerung (2x 1 h) in Xylol überführten wir die Proben in flüssiges Paraffin (62°C; 1 h und ü.N.). Die Einbettung in mit flüssigem Paraffin gefüllten Metallkassetten erfolgte am Folgetag mit anschließender Aushärtung ü.N (Abbildung 9).

5.7.3 Anfertigung der histologischen Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom 3 µm dünn geschnitten (30 Schnitte je Probe), in ein Wasserbad (24°C) überführt und auf Albumin-beschichtete Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen) gebracht. Für Schnitte, die der immunhistologischen Auswertung dienten, verwendeten wir speziell beschichtete

Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen). Nach dem Trocknen auf einer Wärmeplatte (42°C, 20 min) und Aushärtung im Wärmeschrank (62°C ü.N.) färbten wir die Schnitte zur histologischen Auswertung nach untenstehenden Protokollen.

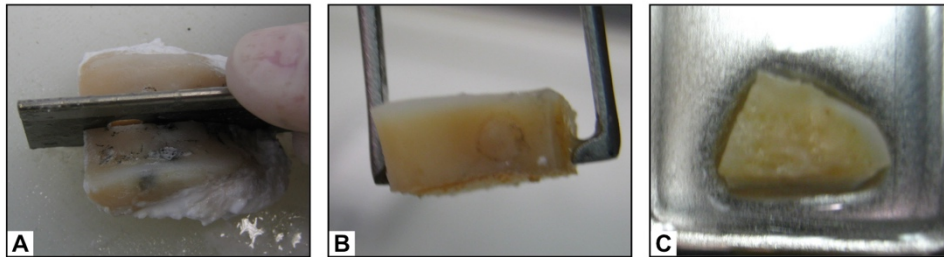


Abbildung 9: Einbettung. Nach Entkalkung werden die Proben grob geschnitten (A). Der Defekt wird vollständig belassen (B). Fixierung in Paraffin-gefüllten Metallkassetten nach Entwässerung (C).

5.7.4 Histologische Färbungen

5.7.4.1 Safranin O/Echtgrün-Färbung

Safranin-Orange (Safranin O) ist ein kationischer Farbstoff, welcher sich direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt des Knorpelgewebes verhält und Glykosaminoglykane selektiv orange-rot färbt [226]. In Kombination mit *Fast-Green* FCF und Hämatoxylin können Zytoplasma, Kollagenfasern sowie Zellkerne ebenfalls sichtbar gemacht werden. Dabei erscheinen Zytoplasma und Kollagenfasern grün und Zellkerne violett-schwarz. L. Rosenberg's Untersuchungen schafften die theoretische Basis für verschiedene histologische Bewertungssysteme. Wie in 5.7.2 beschrieben wurden die Proben zunächst entparaffiniert und hydriert. Wir färbten die Schnitte nach einem modifizierten Protokoll [125] in Hämatoxylin-Lösung nach Weigert 10 min. Anschließend wurden sie in gefiltertem Leitungswasser gewaschen, in Echtgrün-Lösung (0,02%) 4 min gebadet, in Essigsäure (1%) 3x kurz eingetaucht und in Safranin O-Lösung (1%) für 10-12 min gefärbt. Abschließend erfolgten die Dehydrierung, Eindeckung und Austrocknung.

5.7.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, welcher basophile Strukturen (z.B. Zellkern mit DNS) blau färbt. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff welcher azidophile, basische Strukturen (z.B. Zellplasmaproteine) rot färbt. Zunächst erfolgt die Entparaffinierung (in 2x 5 min Xylol) und Hydrierung in absteigender Ethanolreihe (2x 100%, 2x 95%, 1x 80%; jeweils 2,5 min) der Proben. Danach wurden die Schnitte in

gefiltertem Leitungswasser gewaschen, in Hämatoxylin-Lösung (nach Harris) 10 min gefärbt, unter Leitungswasser abgespült, in 1%iger Salzsäure differenziert und in erwärmtem Leitungswasser (60°C) 4 min gebläut. Danach folgte die erneute Färbung in Hämatoxylin (2 ½ min), Spülung in gefiltertem Leitungswasser, Kolorierung in Eosinlösung (1 ½ min), Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe, Xylolbad (2x 5 min) sowie Eindeckung und Austrocknung über Nacht.

5.7.5 Immunhistochemische Färbung

Durch Techniken der Immunhistochemie können spezifische Antigen-Antikörperreaktionen im Gewebsschnitt unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Die indirekte Darstellung einer spezifischen Antigen-Expression ist somit möglich. In der hier angewandten Avidin-Biotin-Methode dienen als Antikörper Immunglobuline der Klasse G (IgG), welche mit spezifischen Antigenen reagieren und einen primären Antikörper-Antigen-Komplex bilden. Ein mit Biotin markierter (biotinylierter) Sekundärantikörper bindet nun an diesen primären Antikörper. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Dabei dient die Peroxidase als enzymatisches Indikatormolekül und wird durch das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch eine Braunfärbung sichtbar gemacht [134]. Nachfolgend wird der Antigen-Nachweis von Typ-I- und Typ-II-Kollagen sowie FGF-2 beschrieben. Die weitere Analyse des Reparaturgewebes erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 45, Hamburg, Deutschland).

5.7.5.1 Nachweis der Typ-I- und Typ-II-Kollagenexpression

Wir nutzten als primäre Antikörper monoklonale anti-Typ-I- und anti-Typ-II-IgG (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland). Alle Proben wurden in Xylol entparaffiniert und in absteigender Ethanolreihe jeweils eine Minute hydriert. Anschließend wurden sie zweimal (jeweils 1 min) in gefiltertem Leitungswasser gewaschen, in Wasserstoffperoxid-Lösung (0,3%) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit PBS-Lösung gespült. Es folgte die Andauung in Trypsin-Lösung (0,1%) bei 37°C für 10 Minuten im Inkubator mit danach folgender Spülung in PBS-Lösung (5 min) und anschließender Überführung in einen Blockierungspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zwischenzeitlich wurden primäre Typ-I-Kollagen- und Typ-II-Kollagen-Antikörper in Blockierungspuffer verdünnt (Anti-Typ-I-Kollagen-IgG: 1 zu 90, Anti-Typ-II-Kollagen-IgG: 1 zu 45). Die Präparate wurden nun in eine Nasskammer überführt, mit den jeweiligen verdünnten Antikörpern bedeckt und bei Raumtemperatur

inkubiert (1h). Anschließend wurden alle Objektträger zweimal mit PBS gespült, mit einem sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper (biotinyliert, Verdünnung 1:200 in PBS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bedeckt und über Nacht inkubiert (bei 4°C). Es folgte die Applikation von ABC-Reagenz, die Inkubation mit DAB-Lösung (7 min bei Raumtemperatur), jeweils nach dreimaliger Spülung mit PBS (jeweils 5 min). Abschließend wurden die Präparate in *aqua bidest* gespült (1 min), entwässert und eingedeckt [153].

5.7.5.2 Nachweis der FGF-2-Expression

Wir nutzten als primäre Antikörper polyklonale anti-FGF-2-IgG (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland). Die entsprechenden Vorbereitungen (Entparaffinierung, Hydratation) sowie die Andauung in einer Trypsin-Lösung und Spülung in PBS erfolgten wie unter Punkt 5.7.5.1 beschrieben. Nach Verdünnung des anti-FGF-2-Antikörpers (1:50) wurden je 200µl des Antikörpers auf die Schnitte aufgebracht, in eine Nasskammer überführt und über Nacht für 8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Objektträger mit einem biotinylierten sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper (biotinyliert, Verdünnung 1:200 in PBS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bedeckt und inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten unter Anwendung der ABC-Methode wie unter Punkt 5.7.5.1 beschrieben.

5.7.6 *Bewertungssysteme*

5.7.6.1 Evaluation des osteochondralen Reparaturgewebes

Nach Safranin O/Echtgrün-Färbung der histologischen Schnitte erfolgte die Evaluation des osteochondralen Reparaturgewebes unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 45, Hamburg, Deutschland) anhand des semiquantitativen, inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* (Tabelle 8, max. 31 Punkte: kein Reparaturgewebe; min. 0 Punkte: komplette Reparatur mit hyalinem Knorpel) [235]. Bewertet wurden knorpeliges Reparaturgewebe und osteochondraler Knochen. Insgesamt bewerteten wir 224 histologische Schnitte (jeweils zwei Defekte pro Knie, n= 28). Proximale und distale Defekte der *Trochlea femoris* untersuchten wir getrennt oder fassten sie zu einem Mittelwert zusammen [186]. Der Gesamtpunktwert der kumulativen Betrachtung der proximalen und distalen Defekte definierten wir als strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur.

<i>Parameter</i>	<i>Punkte</i>
1. Defektfüllung (in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel)	
91-110%	0
76-90% oder 111-125%	1
51-75%	2
26-50%	3
<25%	4
2. Integration des Reparaturgewebes in den umliegenden Knorpel	
normale Kontinuität	0
verminderte Zellularität	1
Spalte auf einer Seite	2
Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin O/Echtgrün	
normal	0
leicht vermindert	1
mittelstark vermindert	2
stark vermindert	3
keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie	
normal	0
vorwiegend runde Zellen, Chondrozytenmorphologie	
75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
25-75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
<25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
50% runde Zellen, Chondrozytenmorphologie,	
75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
25-75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
<25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	
normal	0
1-3 kleine Defekte	1
1-3 große Defekte	2
>3 große Defekte	3
Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur (Fibrillation= Auffaserung der Oberfläche)	
normal	0
leichte Fibrillationen	1
mittelstarke Fibrillationen	2
starke Fibrillationen	3
7. Neubildung des subchondralen Knochens unterhalb des Defektes	
90-100%	0
75-89%	1
50-74%	2

25-49%	3
<25%	4
8. Formation der <i>tidemark</i>	
vollständig	0
75-89%	1
50-74%	2
25-49%	3
<25%	4

Tabelle 8: Histologische Beurteilung der Knorpelreparatur (nach Sellers *et al.*) [235].

5.7.6.2 Evaluation des angrenzenden Knorpels

Die Evaluation des angrenzenden Knorpels erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 45, Hamburg, Deutschland). Pro Defekt bewerteten wir 3 Schnitte mittels des etablierten inversen Bewertungssystems nach Little *et al.* (Tabelle 9, max. 25 Punkte: restlos aufgebrauchter Knorpel; min. 0 Punkte: hyaliner Knorpel) [142].

<i>Kategorie</i>	<i>Parameter</i>	<i>Punkte</i>
1. Struktur*	normal	0
	leichte Oberflächenirregularitäten (Oberfläche kaum zerrissen)	1
	moderate Oberflächenirregularitäten (raue Oberfläche)	2
	massive Oberflächenirregularitäten (Riss, Fissur <10% Tiefe)	3
	Fissuren bis zur Transitionalzone	4
	Fissuren bis zur radialen Zone	5
	Fissuren bis zur kalzifizierten Zone	6
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	7
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	8
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	9
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zum subchondralen Knochen	10
2. Chondrozyten-dichte	normal	0
	erhöht oder leicht erniedrigt	1
	moderat erniedrigt	2
	massiv erniedrigt	3
	keine Zellen	4
3. Zellklone	normal	0
	einzelne Duplets	1
	viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	multiple Zellnester oder keine Zellen	4
	normal	0

4. Safranin O/	erniedrigte Färbung bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
Echtgrün-Färbung*	erniedrigte Färbung bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
	erniedrigte Färbung bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	3
	keine Färbung	4
5. Tidemark/	intakte subchondrale Knochenplatte + eine <i>tidemark</i>	0
kalzifizierter	intakte subchondrale Knochenplatte + doppelte <i>tidemark</i>	1
Knorpel/	Blutgefäße penetrieren die subchondrale Knochenplatte bis zur	2
subchondraler	kalzifizierten Zone	
Knochen*	Blutgefäße penetrieren die <i>tidemark</i>	3

Tabelle 9: Histologische Beurteilung des angrenzenden Knorpels (nach Little *et al.*) [142].

* Beurteilung des schlechtesten Areals.

5.7.7 Histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Analyse der histologischen Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX 45, Hamburg, Deutschland) mit einer montierten Digitalkamera (CC-12, Soft Imaging System, Münster, Deutschland). Die digitalisierten Bilder wurden mittels einer Bildanalyse-Software (AnalySIS, Soft Imaging System, Münster, Deutschland) untersucht.

5.7.7.1 Transgenexpression von FGF-2

Spezifische anti-FGF-2-Antikörper wurden in histologischen Schnitten anhand der immunhistochemischen ABC-Methode unter Verwendung eines biotinylierten, sekundären Antikörpers und DAB als Chromogen gefärbt (Kapitel 5.7.5.2). Durch die spezifische Braunfärbung konnte die FGF-2-Transgenexpression im Gewebe analysiert werden [51]. Hierzu bestimmten wir den prozentualen Anteil der FGF-2-gefärbten Zellen in definierten Ausschnitten histologischer Schnitte von osteochondralen Defekten. Ein histologischer Schnitt jedes Defektes wurde bei 20- und 40-facher Vergrößerung verblindet evaluiert [186].

5.7.7.2 Zelldichte

Wir bestimmten die Zelldichte (Zellen pro mm²) in den Defekten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Wir definierten jeweils zwei Areale mit einer Breite von 100 µm und einer Tiefe von 100 µm im Defekt (Abbildung 10) [9,186]. Die Defekte betrachteten wir unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 45, Hamburg, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung.

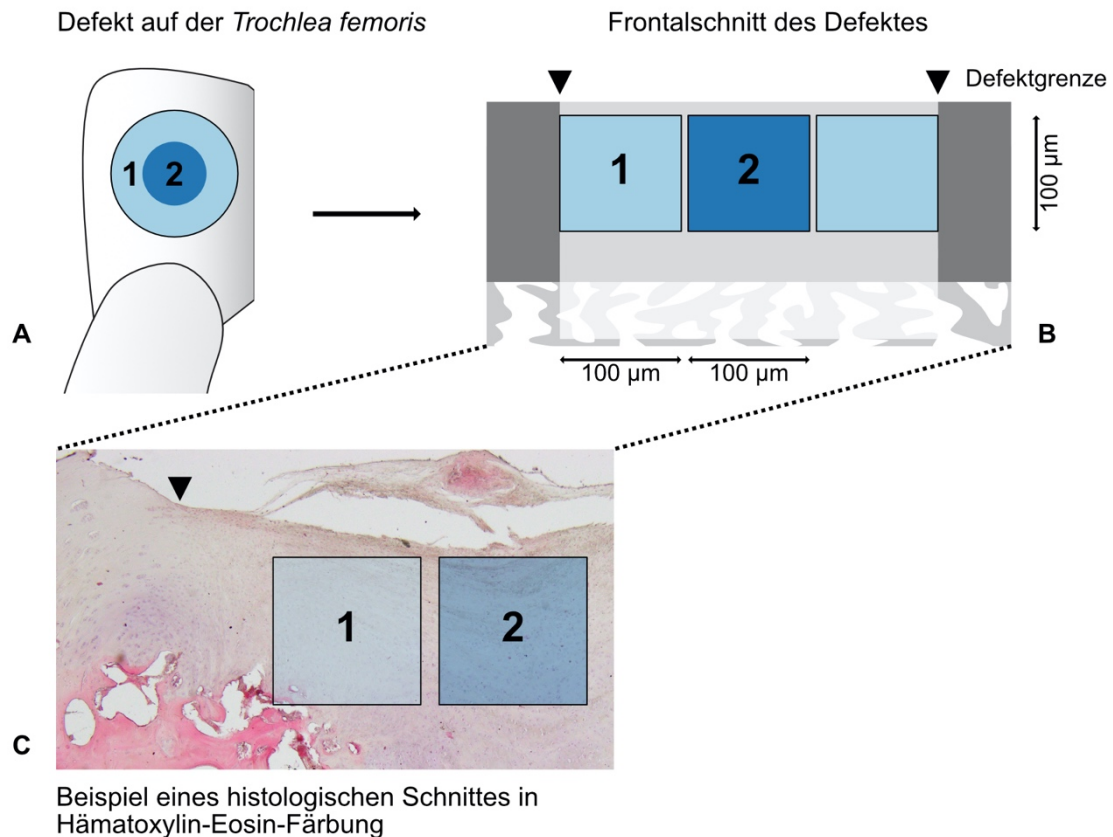


Abbildung 10: Bestimmung der Zelldichte. Unterteilung der Defekte in eine periphere (1) und zentrale Zone (2), Ansicht von oben (A). Schematische Darstellung im Frontalschnitt (B). Die definierten Zonen haben jeweils eine Ausdehnung von 100x 100 μ m. Die Auswertung erfolgt im histologischen Schnitt nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung unter dem Lichtmikroskop (C). Die Pfeile kennzeichnen die Defektgrenze bzw. Integrationszone.

5.7.7.3 Typ-II- und Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität

Typ-I- und Typ-II-Kollagen wurden durch die Braunfärbung anhand der immunhistochemischen ABC-Methode sichtbar gemacht (Kapitel 5.7.5.1). Die Immunreaktivität von Typ-I- und Typ-II-Kollagen entspricht der Farbintensität und lässt sich durch ein semiquantitatives Bewertungssystem nach Orth *et al.* [203] evaluieren (Tabelle 10). Subchondraler Knochen wird in der Typ-I-Kollagen-spezifischen Färbung braun gefärbt und dient in der Bewertung als Positivkontrolle (Negativkontrolle: normaler Gelenkknorpel). Analog dient der subchondrale Knochen in der Typ-II-Kollagen-spezifischen Färbung als Negativkontrolle, normaler Gelenkknorpel wird vermehrt braun angefärbt (Positivkontrolle) (Abbildung 11). Je Defekt wurde ein Schnitt bei 20- und 40-facher Vergrößerung von einem Untersucher verblindet evaluiert. Wir fassten die Punktzahlen der proximalen und distalen *Trochlea femoris* zu einem Mittelwert der jeweiligen Gruppe zusammen. Um das Kollagennetzwerk (Doppelbrechung,

Orientierung, Anisotropie) des Reparaturgewebes darstellen zu können, wurde die Polarisationsmikroskopie verwendet [198].

<i>Immunreaktivität*</i>	<i>Punkte</i>
keine Immunreaktion	0
signifikant geringere Immunreaktion	1
moderat geringere Immunreaktion	2
gleiche Immunreaktion	3
höhere Immunreaktion	4

Tabelle 10: Semiquantitative Bewertung der Immunreaktivität. *Intensität der Braunfärbung entspricht der Immunreaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle [203].

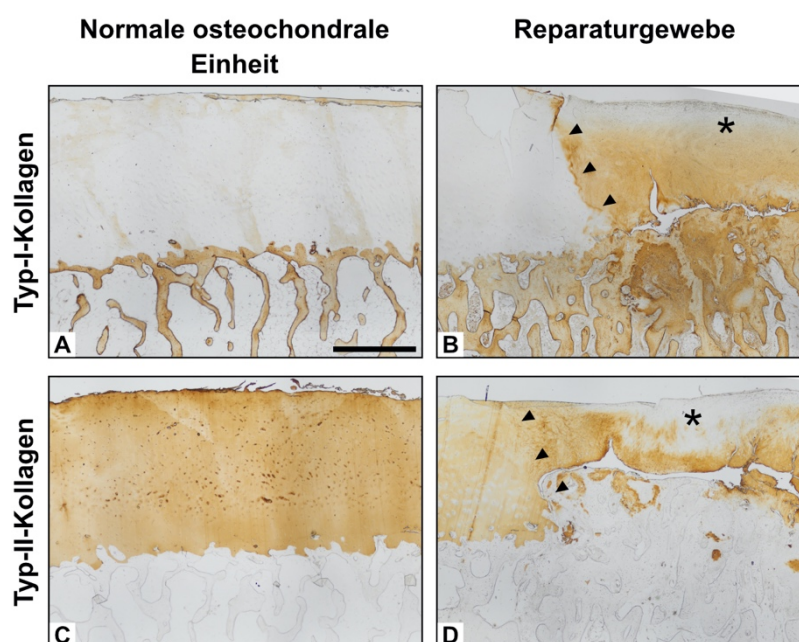


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung und Auswertung. In der Typ-I-Kollagen-spezifischen Färbung wird im intakten Gelenkknorpel der subchondrale Knochen braun gefärbt (Positivkontrolle; **A**). Beispielhafte Darstellung des Reparaturgewebes (*) eines humanen chondralen Defektes (**B**). Die Intensität der Braunfärbung des Reparaturgewebes entspricht der Immunreaktivität von Typ-I-Kollagen im Vergleich zum subchondralen Knochen. Analog wird in der Typ-II-Kollagen-spezifischen Färbung intakter Gelenkknorpel braun gefärbt (Positivkontrolle; **C**). Die Intensität der Braunfärbung des Reparaturgewebes entspricht der Immunreaktivität von Typ-II-Kollagen (**D**). (**A-D**) Humane Präparate; Maßstabsbalken: 1 mm. * Reparaturgewebe; Pfeile kennzeichnen die Defektgrenzen.

5.8 Biochemische Verfahren

5.8.1 Papain-Verdau

Alle Proben wurden einer mit PBS verdünnten Papain-Lösung (0,5 mg/ ml) zugeführt und über Nacht bei 60°C inkubiert [44].

5.8.2 DNS-Bestimmung (Hoechst 33258-Test)

In einer schwarzen Mikrotiterplatte (96-well-Platte) wurde eine Standardreihe (A-H) angelegt (Standard-DNS-Konzentration: 10 µg/ml). Pro Vertiefung wurden 10 µl der Papain-verdauten Probe pipettiert und je 90 µl TNE-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde jeder Probe 100 µl des verdünnten Farbstoffes (1:500 mit TNE-Puffer) lichtgeschützt zugefügt. In einem GENios Spektrophotometer/Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm die Emissionen der Wellenlänge 465 nm detektiert. Nun konnte anhand des bekannten DNS-Gehaltes der Standardreihe und einer Kalibrierungsgeraden der DNS-Gehalt jeder Probe errechnet werden [44].

5.8.3 Protein-Bestimmung (BCA-Test)

Um die gesamte Zellproteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein Protein-Assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific Life Sciences, Schwerte, Deutschland) genutzt. In einer transparenten Mikrotiterplatte (96-well-Platte) wurde eine Standardreihe (A-H) mit 25 µl Standardlösung pro Vertiefung angelegt. In jede Vertiefung wurde 5 µl zuvor verdauter Probelösung pipettiert sowie 200 µl des vorbereiteten Arbeitsreagenz hinzugefügt und auf einem Plattenschüttler 30 Sekunden gemischt. In einem Wärmeschrank (37°C) wurden die Lösungen anschließend 30 Minuten inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption in einem GENios Spektrophotometer/Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Anhand einer Kalibrierungsgeraden konnte die Proteinkonzentration von jeder Probe berechnet werden.

5.8.4 Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)

Zunächst wurde eine gepufferte Dimethylmethylenblau-Lösung (DMMB-Lösung) hergestellt. Dazu wurden 16 mg DMMB in 5 ml 95%-igem Ethanol gelöst, 3 ml Ameisensäure und 25,6 ml von ein-molekularem Natriumhydroxid zugegeben und bis auf 1 l Gesamtvolumen mit *aqua bidest* lichtgeschützt aufgefüllt. Eine Standardreihe (A-F) mit 40 µl Standardlösung (aus Lösungen A-C) pro Vertiefung wurde angelegt und jeweils 250 µl DMMB-Lösung hinzugegeben. 10 µl einer Probe wurden jeweils 30 µl einer zuvor hergestellten Lösung A und 250 µl DMMB appliziert. Die Absorption wurde in einem GENios Spektrophotometer/Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 530 nm detektiert und die Proteoglykankonzentration wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden errechnet [44].

5.9 Mikro-computertomografische Auswertung

5.9.1 Mikro-Computertomographie

Alle Proben der proximalen und distalen Defekte wurden mit einem Mikro-Computertomograph (mCT; Skyscan® Modell 1172, Bruker, Kontich, Belgien) gescannt. Dieser ist mit einer 11 Megapixel Röntgenkamera (12-bit digitale CCD-Kamera) mit einer maximalen Bildweite von 50 mm ausgestattet. Das Gerät besitzt eine drehbare Abtastbühne sowie eine Mikrofokus-Röntgenröhre (Spotgröße < 5 µm; Hamamatsu, Japan) mit einer maximalen Auflösung von 0,8 µm. Zur Reduzierung von Strahlaufhärtingsartefakten (*beam-hardening*) wurde ein 0,5 mm Aluminium/Kupfer Filter zwischen Röntgenstrahlenquelle und Röntgendetektor platziert. Wir erstellten pro Probe zwischen 900 und 2000 Bilder (16-bit) bei zuvor festgelegter Röhrenspannung (70 kV) und Stromstärke (140 µA) in mittlerer Auflösung (13 µm). Die Kamera rotierte in 0,4° Schritten mit einer Belichtungszeit von 1770 ms um die Probe. Anhand empirischer Vorversuche sowie bereits veröffentlichten Protokollen [58,199,208] wählten wir die Parameter *frame averaging* (3), *random movement* (15) und *ring artefact correction* (7). Die Schritte der Mikro-CT-Auswertung werden in Abbildung 12 dargestellt.

5.9.2 Fixierung

Zunächst wurden die in Formalin-Aldehyd gelagerten Proben in eine 70% Ethanol-Lösung überführt. Wir fixierten die Proben in einem röntgendurchlässigen, modifizierten Zentrifugen-Röhrchen mit handelsüblichen Strohhalmen, um Bewegungsartefakte während des Scanvorgangs zu vermeiden.

5.9.3 Scan, Rekonstruktion und Rotation

Dem Nativ-Scan mit den oben genannten Einstellungen folgte eine Rekonstruktion in ein zweidimensionales Schnittbild durch einen modifizierten Feldkamp-Algorithmus (*cone-beam reconstruction*, Programm „NRecon“) [68]. In diesem Schritt wurden durch Software-basierte Algorithmen (Programm „NRecon“) Ring- und Strahlaufhärtingsartefakte reduziert. Zum standardisierten Einzeichnen der „Regionen von Interesse“ (engl. *regions of interest*, ROI) war eine Rotation aus der transversalen Ausrichtung des Bildstapels in die sagittale Ebene ohne Qualitäts- und Dimensionsverlust notwendig (Programm „Data Viewer“).

5.9.4 Standardisierte Definition der VOI

Für die Analyse der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens sowie der dreidimensionalen Darstellung der Morphologie war es notwendig, zweidimensionale „Regionen von Interesse (engl. *regions of interest*, ROIs) in der sagittalen Ebene zu definieren. Durch dreidimensionale Extrapolation resultierten daraus „Volumen von Interesse“ (engl. *volumes of interest*, VOI). Die Definition der ROIs bzw. VOIs orientierte sich an den mikroanatomischen Strukturen der osteochondralen Einheit (Abbildung 13). Zur morphologischen Analyse wurden pro osteochondralem Defekt vier VOIs bestimmt: Die „subchondrale Knochenplatte des Defektes“ (SKD) mit einem maximalen Durchmesser von 3,5 mm, der darunterliegenden „subchondralen Spongiosa des Defektes“ (SSD) mit einer maximalen Tiefe von 8 mm und jeweils VOIs der angrenzenden subchondralen Knochenplatte lateral (SKL) sowie subchondrale Spongiosa lateral (SSL), definiert als normale osteochondrale Einheit. Dabei wurde darauf geachtet, dass keines der Areale überlappt. Wir definierten insgesamt 56 VOIs [186].

5.9.5 Analyse und 3D-Rekonstruktion

Um die Knochendichte und morphologische Parameter (5.9.6) zu bestimmen, wurden die VOIs der rekonstruierten Bildstapel in segmentierte, binäre Bilder umgewandelt. Wir wählten dafür Graustufen-Schwellenwerte von 89 bis 255. Die Auswahl dieser Schwellenwerte wurde anhand von Vorversuchen getroffen [58,198,208]. Zur Bestimmung der Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; BMD) dienten zwei Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome mit bekannten BMD-Werten von 250 und 750 mg CaHA/cm³ als Eichparameter (in 70%-igem Ethanol). Durch die ermittelten Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten) konnte nun die Knochenmineraldichte bestimmt werden. Die komplexe Anordnung der osteochondralen Defekte sowie das Auftreten von morphologischen Veränderungen der subchondralen Einheit machten eine dreidimensionale Darstellung der Strukturen notwendig. Dreidimensionale Modelle wurden auf Grundlage der segmentierten, binären Bilder mit dem Softwareprogramm CTVox gerendert und visualisiert.

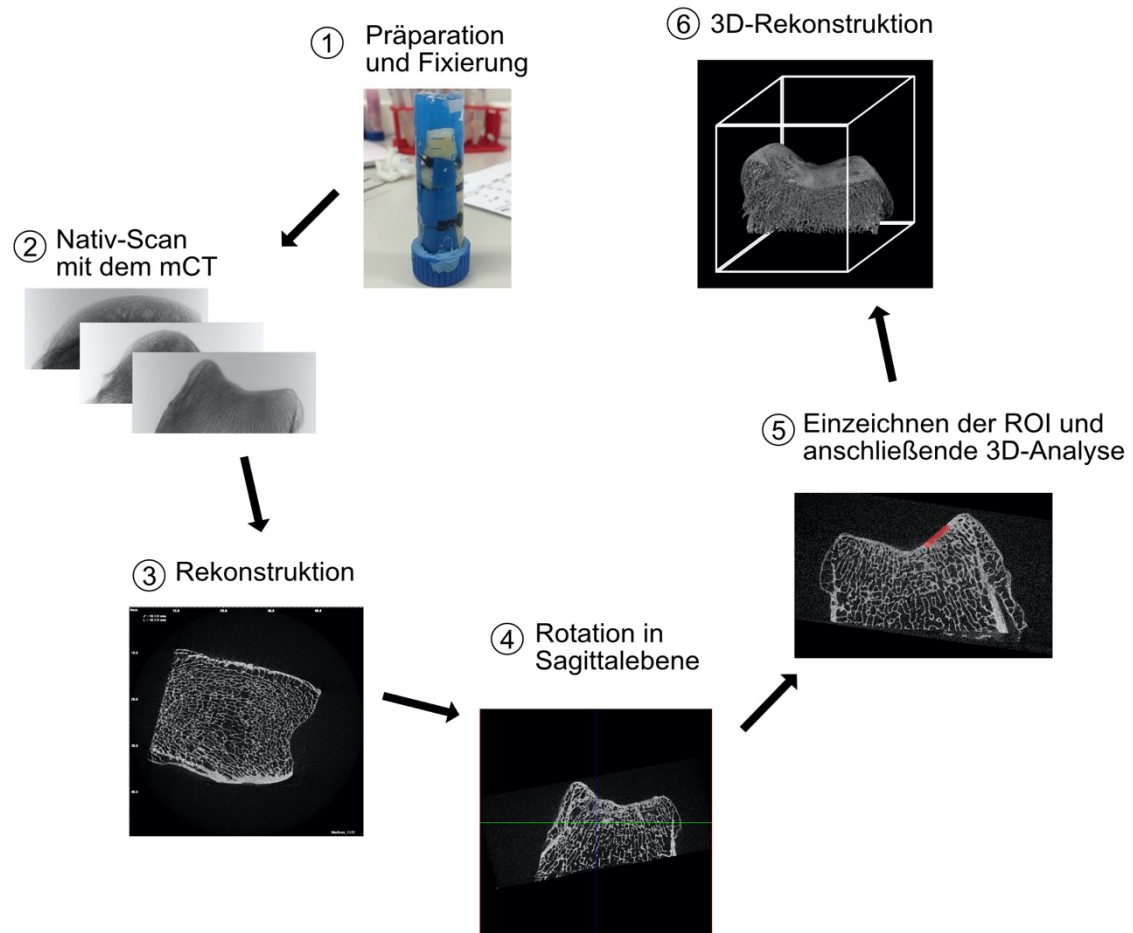


Abbildung 12: Schritte der Mikro-CT-Auswertung.

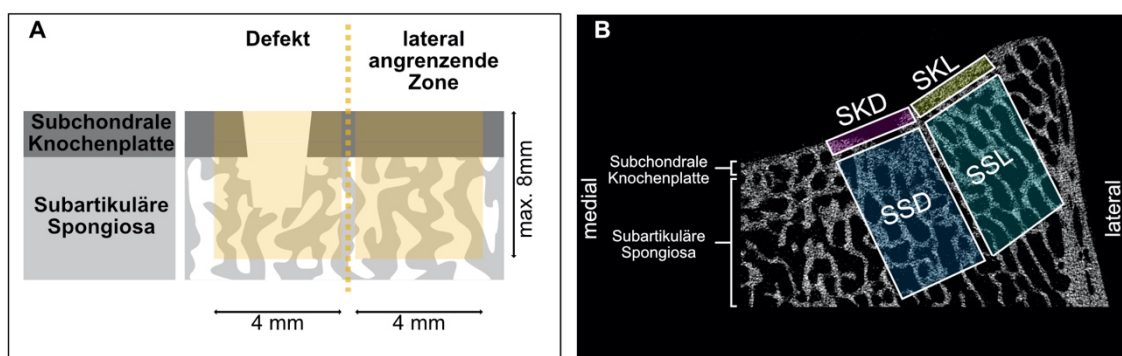


Abbildung 13: Definition der *regions of interest* (ROI). Schematische Darstellung der ROIs (A) und Einzeichnung im rekonstruierten Mikro-CT-Einzelbild (B). SKD= subchondrale Knochenplatte Defekt, SSD= subartikuläre Spongiosa Defekt, SKL= angrenzende subchondrale Knochenplatte *lateral*, SSL= angrenzende subartikuläre Spongiosa *lateral*.

5.9.6 Morphologische Mikro-CT Parameter

Folgende Parameter wurden mit dem Programm CTAnalyzer für jede VOI bestimmt:

<i>Symbol</i>	<i>Parameter</i>	<i>Einheit</i>	<i>Beschreibung</i>
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)	mg/cm^3	Kalksalzgehalt des Knochens
BV/TV	Knochenvolumenanteil (<i>bone volume fraction</i>)	%	Verhältnis des Knochenvolumen zum Gesamtvolumen, relative Knochendichte
BS/BV	Knochenoberfläche/ Knochenvolumen Verhältnis (<i>bone surface/volume ratio</i>)	mm^{-1}	Freie Oberfläche des Knochens, an der Knochenumbau stattfinden kann
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)	mm^{-1}	Anteil der Knochenoberfläche am Gesamtvolumen der VOI
Ct.Th	Kortikale Dicke (<i>cortical thickness</i>)	mm	Durchschnittliche kortikale Dicke
Tb.Th	Trabekeldicke (<i>trabecular thickness</i>)	mm	Mittlere Trabekeldicke, Maß für die Stabilität des Knochens
Tb.Sp	Trabekelabstand (<i>trabecular separation</i>)	mm	Mittlerer Abstand zwischen Trabekeln, Maß des durchschnittlichen Porendurchmessers
Tb.Pf	Trabekulärer Knochen- Anordnungsfaktor (<i>trabecular pattern factor</i>)	mm^{-1}	Umgekehrtes Maß für die Konnektivität/Verknüpfungsdichte.
Tb.N	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)	mm^{-1}	Durchschnittliche Anzahl an Trabekeln pro Längeneinheit
SMI	Struktur-Model-Index (<i>structure model index</i>)	-/-	Indikator für die Trabekelstruktur: 0 für parallele Platten, 3 für zylindrische Stäbe
DA	Grad der Anisotropie (<i>degree of anisotropy</i>)	-/-	Grad der Richtungsabhängigkeit der Trabekel, 1: isotropisch, >1: anisotropisch (keine Längengleichheit in unterschiedlichen Raumrichtungen)
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)	-/-	Indikator für die Oberflächenkomplexität

Tabelle 11: Parameter der Mikro-CT Analyse

5.10 Statistische Verfahren

Bei der histologischen Auswertung nach Sellers *et al.* wurde zwischen einem kumulativen Vergleich von hFGF-2- und *lacZ*-behandelten Defekten der gesamten *Trochlea femoris* (proximale und distale *Trochlea femoris* zusammengefasst) sowie einer separaten Betrachtung der Regionen unterschieden. Für die kumulative Betrachtung wurde eine *multilevel mixed-effects generalized linear model* Prozedur des Statistikprogramms Stata Software (Stata Corp. release 15, College Station, TX, USA) mit wiederholten Messungen benutzt. Diese Methode berücksichtigte individuelle Schafe und Kniegelenkseiten und integrierte sie in das Modell. Zweigeteilte P-Werte für die unterschiedlichen Regionen (proximale *Trochlea femoris*, distale *Trochlea femoris*) wurden durch einen F-Test eines *general linear mixed-regression model* ANOVA bestimmt. Dabei wurde die MIXED-Prozedur des Statistikprogramms SPSS (IBM; Armonk, NY, USA) mit wiederholten Messungen benutzt. Diese komplexen statistischen Analysen zur histologischen osteochondralen Reparatur führte Herr D. Zurakowski (PhD, *Boston Children's Hospital*, MA, USA) durch.

Nachfolgende Analysen wurden am Lehrstuhl für experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung (Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt. Ein Shapiro-Wilk-Test zeigte keine Normalverteilung der makroskopischen Analyse. Ein *Mann-Whitney U*-Test wurde benutzt, um Unterschiede zwischen *lacZ*- und hFGF-2-behandelten Defekten zu bestimmen. Die Regionen betrachteten wir kumulativ. Die mikro-computertomografischen Daten folgen einer Normalverteilung. Eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit *post-hoc* Analyse wurde durchgeführt um 3 Gruppen kumulativ miteinander zu vergleichen aber auch, um einen paarweisen Vergleich der Gruppen untereinander durchführen zu können. Dazu wurde die Software GraphPad PRISM 8 (Graphpad Software Inc; USA) verwendet. Falls nicht anders beschrieben, wurde für die übrigen Analysen ein zweiseitiger t-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz angewandt. Alle Daten werden nachfolgend als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes oder Standardabweichung beschrieben. Ein *P*-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

6. Ergebnisse

6.1 FGF-2-Transgenexpression

Die FGF-2-Transgenexpression im Gewebe nach rAAV-Behandlung wurde durch einen spezifischen anti-FGF-2-Antikörper in histologischen Schnitten immunhistochemisch analysiert (rAAV-hFGF-2 *versus* rAAV-lacZ) (Kapitel 5.7.5.2) [186]. Die Anzahl der FGF-2-positiven Zellen stellte sich signifikant ausgeprägter, 4,8-fach höher, dar im Vergleich zu rAAV-lacZ-behandelten Defekten ($61,8 \pm 2,1\%$ *versus* $12,8 \pm 1,3\%$ FGF-2-positive Zellen, ($P \leq 0,001$). Im umgebenden Knorpelgewebe, im subchondralen Knochen sowie in den Synovialzellen lag keine vermehrte FGF-2-Expression in hFGF-2-behandelten Defekten oder in den lacZ-Kontrolldefekten vor (Abbildung 14).

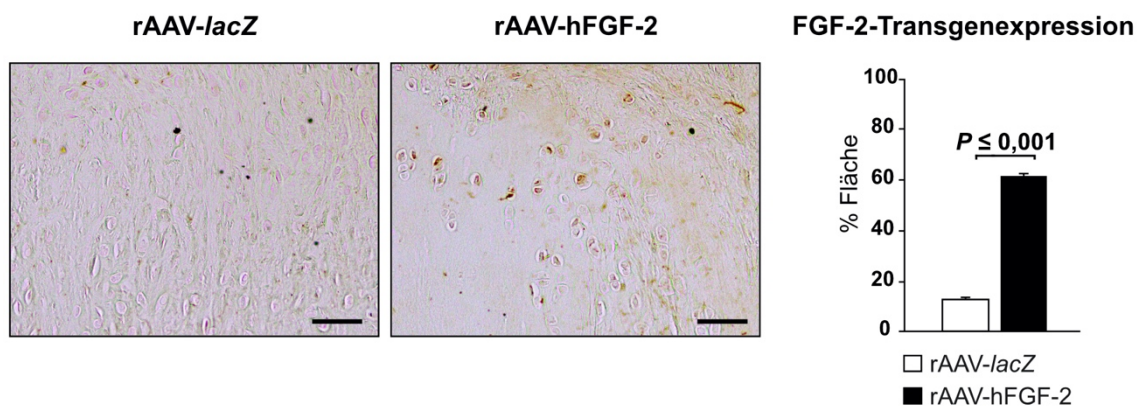


Abbildung 14: Nachweis der hFGF2-Transgenexpression. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte von rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelten Defekten nach Färbung mit einem spezifischen anti-FGF-2-Antikörper. Der Anteil FGF-2-gefärbter Zellen ist als Balkendiagramm dargestellt. Maßstabbalken: 50µm.

6.2 Perifokale Arthrose

Die Bewertung der perifokalen Arthrose erfolgte mit Hilfe des inversen Bewertungssystems nach Little *et al.* (Kapitel 5.7.6.2). Verglichen wurde die angrenzende Zone der Kontroll- und Therapiegruppe, sowohl in einzelner Betrachtung des lateralen und medialen Aspekts als auch zusammengefasst. Interessanterweise zeigten sich hier Unterschiede in den mittleren Gesamtpunktwerten. In Betrachtung der lateral angrenzenden Zone zeigten sich vermehrte Irregularitäten an der Zelloberfläche der hFGF-2-behandelten Gruppe mit bis zu 10% Tiefenausdehnung (mittlere Punktzahl: $3,12 \pm 1,41$). Gleichzeitig war die Chondrozytendichte der hFGF-2-behandelten Gruppe entweder leicht erhöht oder erniedrigt (mittlere Punktzahl: $1,21 \pm 0,51$). Der medial

angrenzende Aspekt beider Gruppen zeigte hingegen nur geringe Oberflächenirregularitäten (rAAV-*lacZ*: $1,05 \pm 0,47$ versus rAAV-hFGF-2: $1,29 \pm 0,25$), die Chondrozytendichte war annähernd normal (rAAV-*lacZ*: $0,71 \pm 0,18$ versus rAAV-hFGF-2: $0,52 \pm 0,16$). rAAV-*lacZ*- und rAAV-hFGF-2-behandelte Proben unterschieden sich nicht in der Anzahl der Zellklone im Bereich des lateral angrenzenden Knorpels (rAAV-*lacZ*: $2,05 \pm 0,18$ versus rAAV-hFGF-2: $2,10 \pm 0,38$). Der mediale Aspekt des angrenzenden Knorpels wies in der Therapiegruppe jedoch weniger Zelldoublets auf (mittlerer Punktwert: $1,74 \pm 0,42$). Lateralseitig war die interterritoriale Safranin O/Echtgrün-Färbung in der Therapiegruppe vermindert (mittlerer Punktwert: $1,33 \pm 0,42$). Die Intensität der Färbung war in der mediallyseitig angrenzenden Zone annähernd normal in beiden Gruppen (rAAV-*lacZ*: $0,50 \pm 0,15$ versus rAAV-hFGF-2: $0,38 \pm 0,15$). Die Intaktheit der subchondralen Platte war in beiden Aspekten annähernd gegeben, wobei die *tidemark* in hFGF-2-behandelten Proben tendenziell singulär ausgeprägt war (lateral Aspekt: $0,64 \pm 0,16$; medialer Aspekt: $0,52 \pm 0,16$). Insgesamt zeigte sich in Betrachtung des mittleren Gesamtpunktwertes des lateral angrenzenden Knorpels eine geringere Degeneration für die Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ*: $5,52 \pm 1,38$ versus rAAV-hFGF-2: $8,40 \pm 2,41$). Umgekehrt stellte sich in medialen Abschnitten der Therapiegruppe eine geringere Degeneration im umgebenen Knorpel dar (rAAV-*lacZ*: $5,45 \pm 0,92$ versus rAAV-hFGF-2: $4,45 \pm 0,62$). Die statistischen Vergleiche von Therapie- und Kontrollgruppen in den einzelnen Aspekten zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Kategorie	Angrenzender Knorpel				P-Wert	
	lateralseitig		mediallyseitig		(a)	(b)
	<i>lacZ</i>	hFGF-2	<i>lacZ</i>	hFGF-2		
Struktur	$0,90 \pm 0,55$	$3,12 \pm 1,41$	$1,29 \pm 0,25$	$1,05 \pm 0,47$	0,197	0,320
Chondrozytendichte	$0,86 \pm 0,29$	$1,21 \pm 0,51$	$0,52 \pm 0,16$	$0,71 \pm 0,18$	0,809	0,539
Zellklone	$2,05 \pm 0,18$	$2,10 \pm 0,38$	$1,74 \pm 0,42$	$2,26 \pm 0,23$	0,912	0,228
Safranin O-Färbung	$0,74 \pm 0,32$	$1,33 \pm 0,42$	$0,38 \pm 0,15$	$0,50 \pm 0,15$	0,178	0,638
<i>tidemark</i> /kalzifizierter Knorpel/SCB	$0,98 \pm 0,31$	$0,64 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,16$	$0,93 \pm 0,23$	0,552	0,166
Gesamtpunktwert	$5,52 \pm 1,38$	$8,40 \pm 2,41$	$4,45 \pm 0,62$	$5,45 \pm 0,92$	0,414	0,513

Tabelle 12: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels (mediale und laterale Zone). Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben, evaluiert nach dem inversen Bewertungssystem nach Little *et al.* (0 Punkte = hyaliner Gelenkknorpel; 25 Punkte = restlos aufgebrauchter Knorpel). Statistische Vergleiche: (a) *lacZ* versus hFGF-2 lateralseitig; (b) *lacZ* versus hFGF-2 mediallyseitig.

Fasst man medialen und lateralen Aspekt zusammen, zeigten sich in der Struktur des umgebenden Knorpels der Kontrollgruppe geringere Anzeichen einer Degeneration

(mittlerer Punktwert: $0,98 \pm 0,5$), ebenso war die Intensität der Safranin O/Echtgrün-Färbung nicht wesentlich erniedrigt (mittlerer Punktwert: $0,62 \pm 0,22$). Die Chondrozytendichte war entweder leicht erhöht oder erniedrigt (rAAV-*lacZ*: $0,79 \pm 0,22$ versus rAAV-hFGF-2: $0,87 \pm 0,26$). Eine geringere Degeneration zugunsten der Therapiegruppe zeigte sich in der Zellklonierung (rAAV-*lacZ*: $2,15 \pm 0,18$ versus rAAV-hFGF-2: $1,92 \pm 0,32$) sowie Intaktheit der subchondralen Platte (mittlerer Punktwert: $0,58 \pm 0,08$). Insgesamt zeigte sich in der Betrachtung des mittleren Gesamtpunktwertes kumulativ eine geringere Degeneration für die Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ*: $5,49 \pm 1,13$ versus rAAV-hFGF-2: $6,43 \pm 1,29$), ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen ($P = 0,608$).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	P-Wert
Struktur	$0,98 \pm 0,50$	$2,20 \pm 0,75$	0,158
Chondrozytendichte	$0,79 \pm 0,22$	$0,87 \pm 0,26$	0,861
Zellklone	$2,15 \pm 0,18$	$1,92 \pm 0,32$	0,580
Safranin O-Färbung	$0,62 \pm 0,22$	$0,86 \pm 0,20$	0,325
tidemark/kalzifizierter Knorpel/SCB	$0,95 \pm 0,26$	$0,58 \pm 0,08$	0,311
Gesamtpunktwert	$5,49 \pm 1,13$	$6,43 \pm 1,29$	0,608

Tabelle 13: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels (kumulative Auswertung). Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben, evaluiert nach dem inversen Bewertungssystem nach Little *et al.* (0 Punkte = hyaliner Gelenkknorpel; 25 Punkte = restlos aufgebrauchter Knorpel).

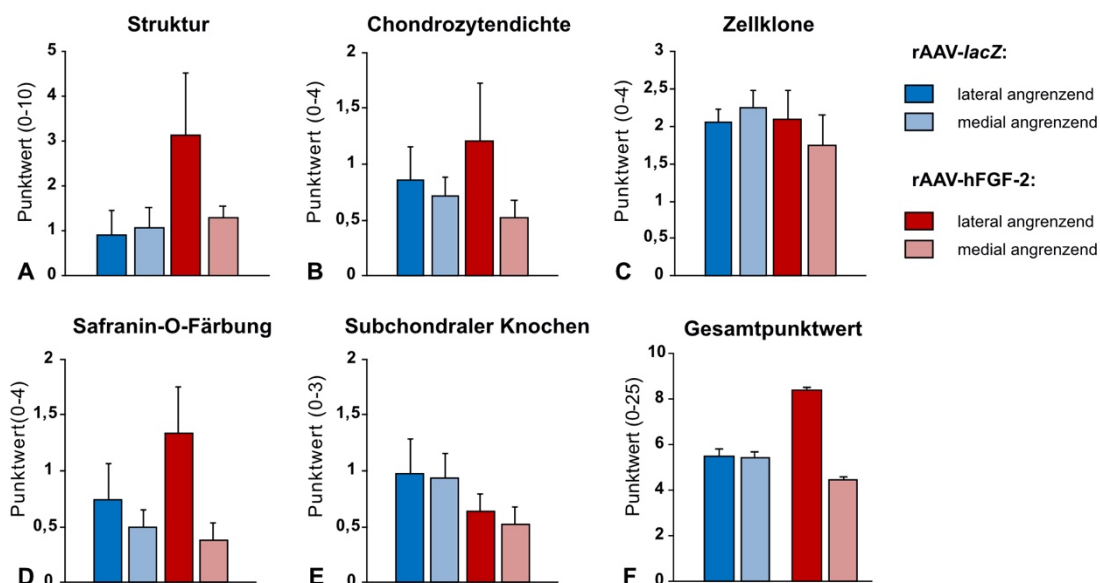


Abbildung 15: Histologische Bewertung des angrenzenden Knorpels. Die Evaluation des angrenzenden Knorpels von rAAV-*lacZ* (blau) und rAAV-hFGF-2-behandelten Defekten (rot) erfolgte anhand des inversen Bewertungssystems nach Little *et al.* Eine Unterscheidung erfolgte zwischen lateral (rAAV-*lacZ*: dunkelblau; hFGF-2: dunkelrot) und medial (rAAV-*lacZ*: hellblau; hFGF-2: hellrot) angrenzendem Knorpel. Als Balkendiagramme sind die Punktwerte der einzelnen Kategorien des inversen Bewertungssystems (A-E) und der Gesamtpunktwerte (F) dargestellt.

6.3 Reparatur des subchondralen Knochens

6.3.1 Analyse der Mikrostruktur durch das mCT

Durch die mikro-computertomografischen Analysen konnte anhand standardisierter ROIs und mit Hilfe festgelegter Parameter (Tabelle 11) die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens bewertet werden. Bewertet wurden die mit *lacZ*-behandelte Kontrollgruppe und die hFGF-2-behandelte Therapiegruppe (jeweils subchondrale Knochenplatte und subartikuläre Spongiosa des Defektes; Abbildung 13). Die angrenzende osteochondrale Einheit (subchondrale Knochenplatte und subartikuläre Spongiosa lateral des Defektes) der Kontrollgruppe diente als Vergleich. Wir definierten sie als normale osteochondrale Einheit (Abbildung 16) [186].

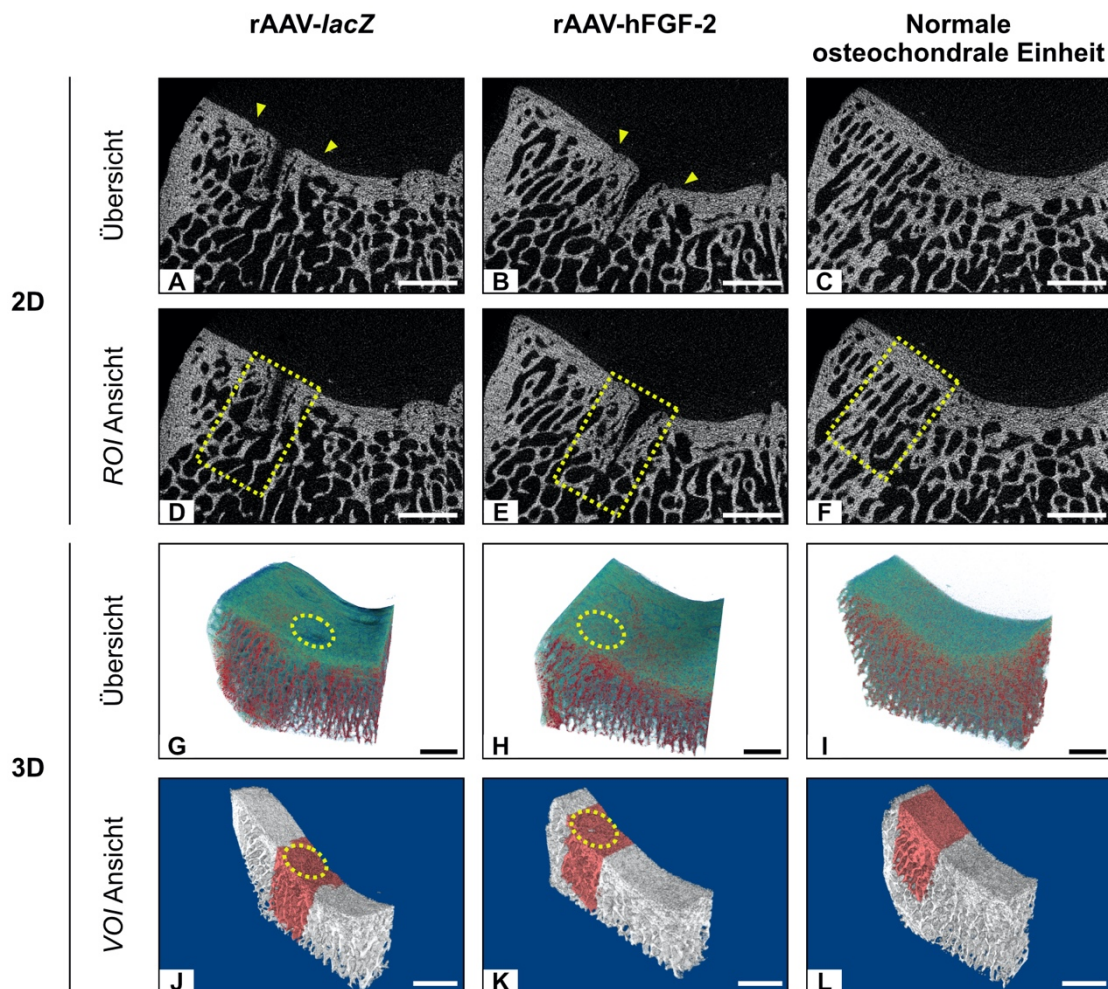


Abbildung 16: Überblick über die Mikro-CT Analysen des subchondralen Knochens. Darstellung der Defektgrenzen und der eingezeichneten, standardisierten *regions of interest* (ROI) von Kontroll- und Therapiegruppe sowie einer normalen osteochondralen Einheit im jeweils repräsentativen, sagittalen Mikro-CT-Einzelbild (A-F). Einen besseren Überblick erhält man im rekonstruierten 3D-Bild mit den jeweils eingezeichneten *volumes of interest* (VOI) (G-L). Maßstabsbalken: 3,5 mm. Die gelben Pfeile kennzeichnen die Defektgrenzen.

6.3.1.1 Bewertung der subchondralen Knochenplatte

Die Analyse der Mikrostruktur im Bereich der osteochondralen Defekte zeigte in der Knochenmineraldichte (BMD) eine Erhöhung für hFGF-2-behandelte Defekte ($669,64 \pm 173,02$ versus $723,99 \pm 204,75$; Einheit: mg/cm^3). Ebenfalls erhöht war die relative Knochendichte (BV/TV in %; $27,63 \pm 9,93$ versus $33,63 \pm 17,47$) zugunsten der Therapiegruppe. Die Knochenoberflächendichte (BS/TV) der Therapiegruppe war erhöht im Vergleich zur lacZ-behandelten Gruppe ($21,42 \pm 2,60$ versus $22,06 \pm 6,13$; Einheit: mm^{-1}). Die kortikale Dicke war für die Therapiegruppe um das 1,5-fache erhöht ($0,89 \pm 0,25$ versus $1,33 \pm 0,95$; Einheit: mm). Interessanterweise war das Verhältnis von Knochenoberfläche zum Knochenvolumen („freie Oberfläche“ des Knochens; BS/BV) in lacZ-behandelten Defekten vermehrt ($83,51 \pm 20,24$ versus $75,92 \pm 25,77$; Einheit: mm^{-1}). Das statistische Signifikanzniveau wurde in den einzelnen Kategorien jeweils nicht erreicht ($P > 0,05$). Im Vergleich der Kontrollgruppe mit der normalen osteochondralen Einheit zeigte sich eine geringere Knochenmineraldichte ($P = 0,914$). Die Knochenmineraldichte der Therapiegruppe war leicht erhöht, jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen ($P = 0,985$).

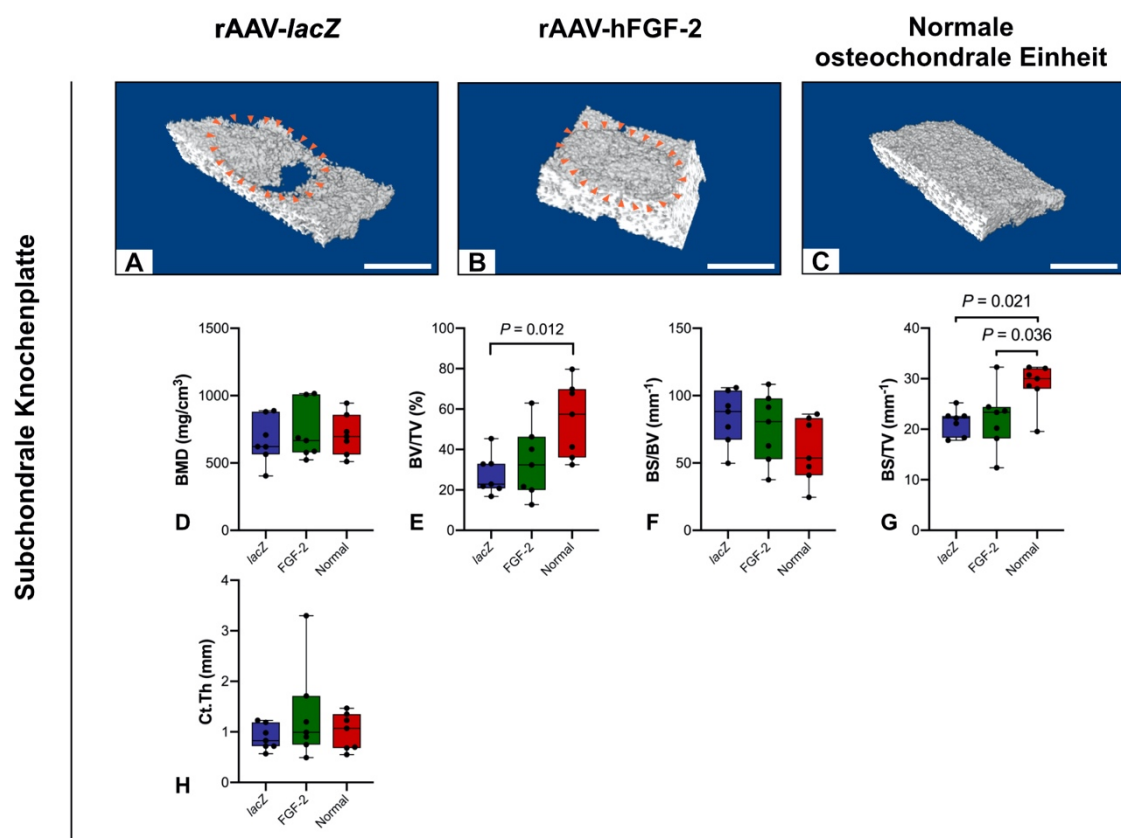


Abbildung 17: Mikro-CT Analyse der subchondralen Knochenplatte. Die 3-D-Rekonstruktionen der subchondralen Knochenplatte repräsentieren rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (A, B) und die normale osteochondrale Einheit (C). Die Punktwerte der einzelnen Parameter sind als Boxplot dargestellt (D-H). Maßstabsbalken: 2 mm. Orangene Pfeile kennzeichnen die Defektgrenzen.

Die relative Knochendichte (BV/TV) betrug für die normale osteochondrale Einheit im Mittelwert 54,95 % ($\pm 18,52$) und war im Vergleich zur Therapie- und Kontrollgruppe erhöht. Statistisch signifikant unterschied sich die relative Knochendichte dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P = 0,012$). Gleichzeitig war die freie Oberfläche des Knochens (BS/BV) der normalen osteochondralen Einheit erhöht ($59,13 \pm 23,74$; P jeweils $> 0,05$). Interessanterweise unterschied sich die Knochenoberflächendichte signifikant von der Kontrollgruppe ($P = 0,021$) und der Therapiegruppe ($P = 0,036$). Sie betrug für die normale osteochondrale Einheit $28,75 \pm 4,36 \text{ mm}^{-1}$ und war somit signifikant höher. Keinen statistisch signifikanten Unterschied wies die kortikale Dicke der normalen osteochondralen Einheit ($1,01 \text{ mm} \pm 0,36 \text{ mm}$) im Vergleich zu *lacZ*- und hFGF-2-behandelten Defekten auf.

6.3.1.2 Bewertung der subartikulären Spongiosa

Die Analyse der morphologischen Parameter im Bereich der subartikulären Spongiosa wurde um die Trabekeldicke (Tb.Th), verschiedene Parameter der Trabekelstruktur (Tb.Sp, Tb.N, SMI), dem Grad der Anisotropie (DA) sowie dem Indikator für die Oberflächenkomplexität (FD) ergänzt. Die Knochenmineraldichte (BMD) war in den hFGF-2-behandelten Defekten erhöht ($704,83 \pm 161,03$ *versus* $720,75 \pm 227,20$; Einheit: mg/cm^3), ebenso die relative Knochendichte (BV/TV in %; $20,08 \pm 5,66$ *versus* $21,30 \pm 6,43$). Interessanterweise war die freie Knochenoberfläche (BS/BV) in hFGF-2-behandelten Defekten um das 1,2-fache reduziert ($84,80 \pm 29,28$ *versus* $73,22 \pm 24,30$; Einheit: mm^{-1}). Auch eine Reduzierung der Knochenoberflächendichte (BS/TV) konnte beobachtet werden ($15,72 \pm 3,31$ *versus* $14,62 \pm 4,37$; Einheit: mm^{-1}). Der durchschnittliche Abstand zwischen den Trabekeln (Tb.Sp; mm) war in der hFGF-2-behandelten Therapiegruppe erhöht ($0,16 \pm 0,07$ *versus* $0,18 \pm 0,08$; $P = 0,773$). Das umgekehrte Maß für die Konnektivität der Trabekel (Tb.Pf) war zugunsten der Therapiegruppe verbessert (rAAV-*lacZ*: $9,23 \pm 21,59$ *versus* rAAV-hFGF-2: $3,50 \pm 18,95$; Einheit: mm^{-1}). Die Anzahl der Trabekeln (Tb.N.) im Bereich des Defektes war in der Therapiegruppe erniedrigt ($4,02 \pm 0,72$ *versus* $3,83 \pm 1,10$; Einheit: mm^{-1}), ebenso das Maß für die dreidimensionale Form der gemessenen Trabekel (SMI; $1,54 \pm 1,00$ *versus* $1,46 \pm 0,85$). Eine geringe Erhöhung zeigte sich im Grad der Anisotropie (DA) für hFGF-2-behandelte Defekte ($0,40 \pm 0,04$ *versus* $0,41 \pm 0,11$). Keine Unterschiede fanden sich in der Dicke der Trabekel (Tb.Th; Mittelwert jeweils $0,05 \text{ mm} \pm$ Standardabweichung) und dem Maß für die Oberflächenkomplexität (FD; Mittelwert jeweils $2,56 \pm$ Standardabweichung). Das statistische Signifikanzniveau konnte bei der Auswertung

der einzelnen Parameter jeweils nicht erreicht werden ($P > 0,05$). Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich in der Analyse der angrenzenden osteochondralen Einheit im Vergleich zur Kontroll- und Therapiegruppe nicht. Die Knochenmineraldichte (BMD; $725,15 \pm 158,60$; Einheit: mg/cm^3) sowie die relative Knochendichte (BV/TV in %; $24,03 \pm 5,46$) waren in der normalen osteochondralen Einheit am Höchsten, ebenso die Knochenoberflächendichte (BS/TV; $15,79 \pm 4,23$; Einheit: mm^{-1}). Dabei war die freie Oberfläche (BS/BV) des Knochens in der normalen osteochondralen Einheit erniedrigt ($70,07 \pm 26,42$ Einheit: mm^{-1}). Eine gering erhöhte trabekuläre Dicke (Tb.Th) konnte in der normalen osteochondralen Einheit beobachtet werden ($0,06 \pm 0,02$; Einheit: mm). Der durchschnittliche Abstand zwischen den Trabekeln (Tb.Sp) betrug in der normalen osteochondralen Einheit $0,17 \text{ mm}$ ($\pm 0,06 \text{ mm}$). Interessanterweise waren das Maß der Verknüpfungsdichte (Tb.Pf; $0,12 \pm 15,39$; Einheit: mm^{-1}), die Trabekelzahl (Tb.N; $3,74 \pm 0,78$; Einheit: mm^{-1}), SMI ($1,40 \pm 1,08$, DA ($0,38 \pm 0,05$) und FD ($2,50 \pm 0,12$) der normalen osteochondralen Einheit im Vergleich zur Kontroll- und Therapiegruppe erniedrigt. Im statistischen Vergleich aller drei Gruppen war kein signifikanter Unterschied bei der Auswertung der jeweiligen Parameter feststellbar ($P > 0,05$).

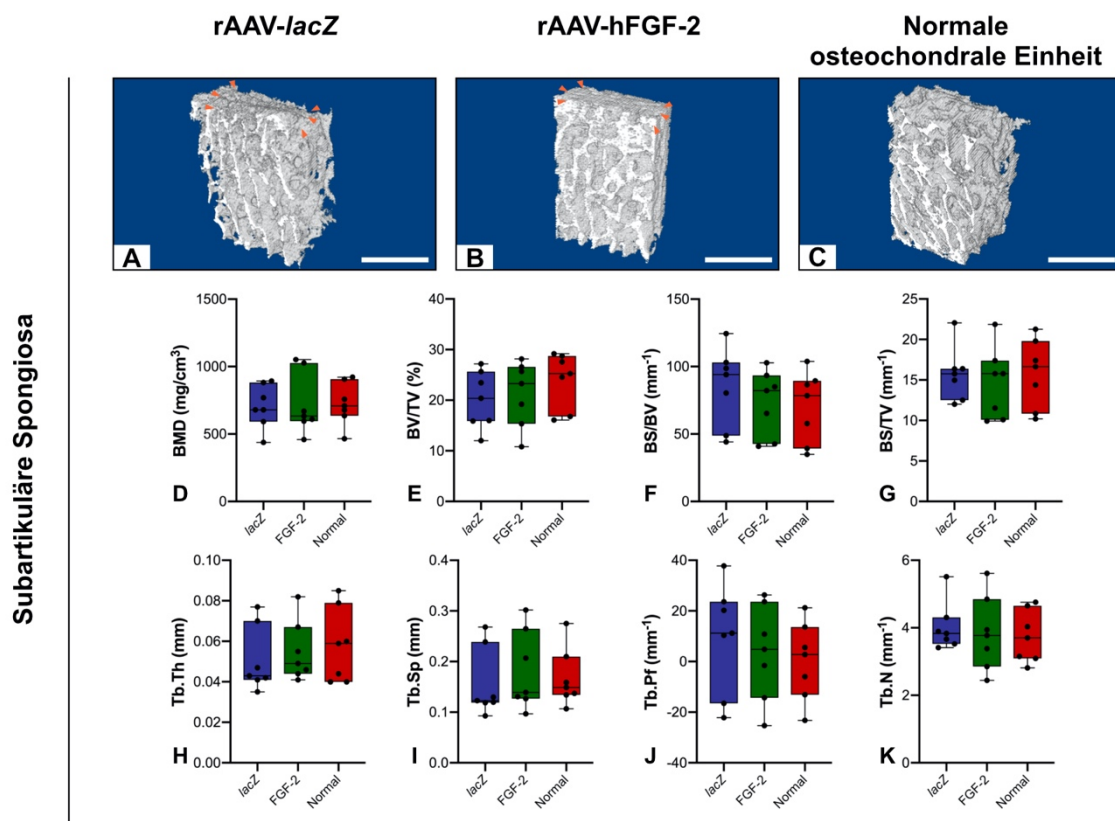


Abbildung 18: Mikro-CT Analyse der subartikulären Spongiosa. Die 3-D-Rekonstruktionen der subchondralen Knochenplatte repräsentieren rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (**A**, **B**) und die normale osteochondrale Einheit (**C**). Die Punktwerte der einzelnen Parameter sind als *Boxplot* dargestellt (**D-K**). Maßstabsbalken: 2 mm. Orangene Pfeile kennzeichnen die Defektgrenzen.

<i>Parameter</i>	rAAV-lacZ	rAAV-hFGF-2	Normale	P-Wert		
			osteochondrale Einheit	<i>(a)</i>	<i>(b)</i>	<i>(c)</i>
Subchondrale Knochenplatte						
BMD (mg/cm³)	669,64 ± 173,02	723,99 ± 204,75	708,28 ± 153,33	0,837	0,914	0,985
BV/TV (%)	27,63 ± 9,93	33,63 ± 17,47	54,95 ± 18,52	0,760	0,012	0,052
BS/BV (mm ⁻¹)	83,51 ± 20,24	75,92 ± 25,77	59,13 ± 23,74	0,818	0,153	0,390
BS/TV (mm ⁻¹)	21,42 ± 2,60	22,06 ± 6,13	28,75 ± 4,36	0,964	0,021	0,036
Ct.Th (mm)	0,89 ± 0,25	1,33 ± 0,95	1,01 ± 0,36	0,376	0,932	0,578
Subartikuläre Spongiosa						
BMD (mg/cm³)	704,83 ± 161,03	720,75 ± 227,20	725,15 ± 158,60	0,986	0,977	0,999
BV/TV (%)	20,08 ± 5,66	21,30 ± 6,43	24,03 ± 5,46	0,921	0,435	0,665
BS/BV (mm ⁻¹)	84,80 ± 29,28	73,22 ± 24,30	70,07 ± 26,42	0,702	0,568	0,974
BS/TV (mm ⁻¹)	15,72 ± 3,31	14,62 ± 4,37	15,79 ± 4,23	0,866	0,999	0,849
Tb.Th (mm)	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,886	0,681	0,926
Tb.Sp (mm)	0,16 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,773	0,949	0,924
Tb.Pf (mm ⁻¹)	9,23 ± 21,59	3,50 ± 18,95	0,12 ± 15,39	0,837	0,644	0,940
Tb.N (mm ⁻¹)	4,02 ± 0,72	3,83 ± 1,10	3,74 ± 0,78	0,920	0,829	0,979
SMI (-/-)	1,54 ± 1,00	1,46 ± 0,85	1,40 ± 1,08	0,988	0,959	0,991
DA (-/-)	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,11	0,38 ± 0,05	0,960	0,805	0,644
FD (-/-)	2,56 ± 0,05	2,56 ± 0,08	2,50 ± 0,12	0,997	0,415	0,456

Tabelle 14: Übersicht der Mikro-CT Analyse. Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Abkürzungen werden im Text erläutert. Statistische Vergleiche: (a) rAAV-lacZ versus rAAV-hFGF-2, (b) lacZ versus normale osteochondrale Einheit, (c) hFGF-2 versus normale osteochondrale Einheit

6.3.2 Histologische Bewertung des subchondralen Knochens

Die semiquantitative, histologische Bewertung des subchondralen Knochens erfolgte anhand des Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [235] in isolierter Betrachtung der Kategorie „Neubildung des subchondralen Knochens“ (Tabelle 8). In der zusammengefassten Betrachtung der Punktwerte für proximale und distale Anteile der *Trochlea femoris* zeigte sich, dass durchschnittlich 75-100% des subchondralen Knochens in der rAAV-FGF-2-behandelten Therapiegruppe neugebildet wurde. Die mittleren Punktwerte waren für die Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert, jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen (rAAV-*lacZ*: $1,22 \pm 0,11$, rAAV-FGF-2: $0,82 \pm 0,08$, $P = 0,120$). Interessanterweise war in einzelner Betrachtung des proximalen Aspektes der *Trochlea femoris* die Neubildung des subchondralen Knochens in hFGF-2-behandelten Defekten signifikant verbessert (rAAV-*lacZ*: $1,29 \pm 0,16$ versus rAAV-hFGF-2: $0,98 \pm 0,16$, $P = 0,048$). Auch die isolierte Betrachtung der distalen Anteile wies einen signifikant verbesserten mittleren Punktwert nach rAAV-hFGF-2-Behandlung im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe auf (rAAV-*lacZ*: $1,15 \pm 0,32$ versus rAAV-hFGF-2: $0,70 \pm 0,32$; $P = 0,003$) (Abbildung 19).

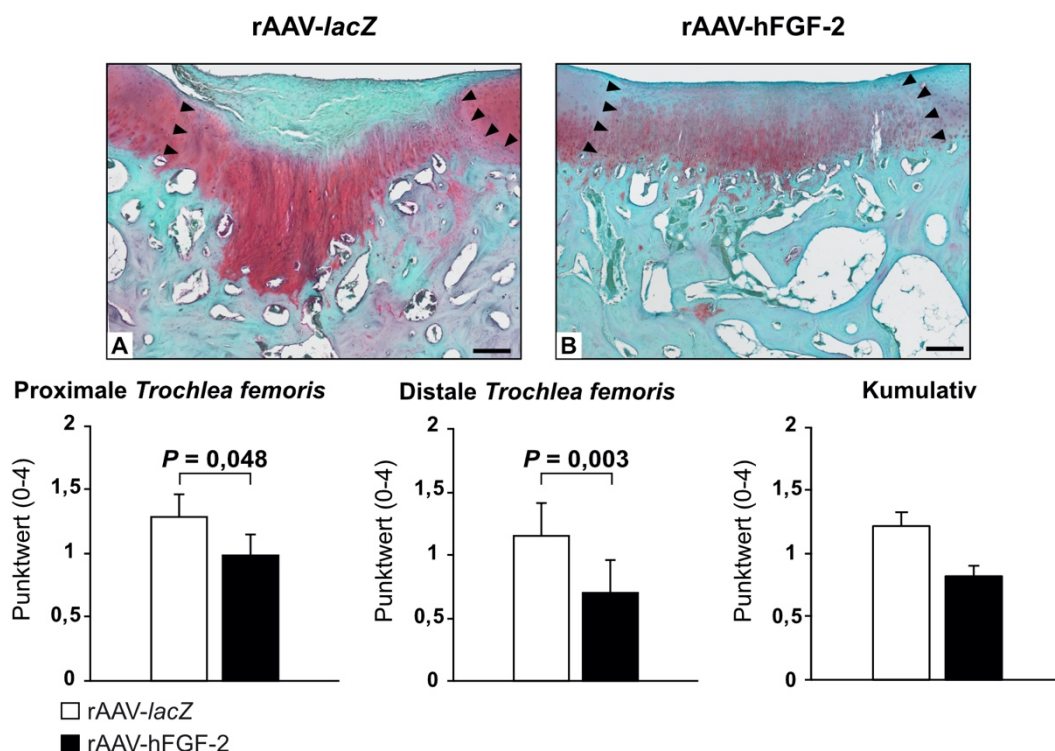


Abbildung 19: Histologische Bewertung des subchondralen Knochens. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte des Reparaturgewebes für rAAV-*lacZ* und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (A, B). Die Evaluation erfolgte anhand des inversen Bewertungssystem nach Sellers *et al.*, die Punktwerte sind als Balkendiagramme dargestellt. Maßstabsbalken: 250 μ m, 4-fache Vergrößerung. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Integrationszone. Safranin O/Echtgrün-Färbung.

6.4 Reparatur des Gelenkknorpels

6.4.1 Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes

6.4.1.1 Evaluation des Reparaturgewebes nach Goebel *et al.*

Die Bewertung der makroskopischen Knorpelreparatur erfolgte anhand des inversen Bewertungssystems nach Goebel *et al.* [85] (Tabelle 6). Nach rAAV-vermitteltem Gentransfer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *lacZ*-behandelten Defekten (mittlerer Punktwert: $3,89 \pm 2,47$) und hFGF-2-behandelten Defekten (mittlerer Punktwert: $4,64 \pm 2,97$; $P = 0,475$). Die Farbe der Defekte war hauptsächlich hyalinartig bis weiß sowohl in der Kontroll- (mittlerer Punktwert: $0,96 \pm 0,79$) als auch in der Therapiegruppe (mittlerer Punktwert: $0,71 \pm 0,66$). In keiner der beiden Gruppen traten vermehrt sichtbare Blutgefäße auf. Oberflächenbeschaffenheit und Defektfüllung waren bei hFGF-2-behandelten Defekten verbessert, jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen. Interessanterweise zeigte sich eine signifikant vermehrte Degeneration des angrenzenden Knorpels bei *lacZ*-behandelten Defekten (*lacZ*-behandelte Defekte: $1,64 \pm 0,68$ versus hFGF-2-behandelte Defekte: $1,61 \pm 0,57$; $P < 0,001$) in der makroskopischen Evaluation des Reparaturgewebes (Abbildung 20, Tabelle 15).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	P-Wert
Farbe des Reparaturgewebes	$0,96 \pm 0,79$	$0,71 \pm 0,66$	0,248
Sichtbare Blutgefäße	$0,46 \pm 0,69$	$0,32 \pm 0,61$	0,462
Beschaffenheit der Oberfläche	$1,18 \pm 0,86$	$1,04 \pm 0,88$	0,520
Defektfüllung	$0,39 \pm 0,63$	$0,21 \pm 0,63$	0,174
Degeneration des angrenzenden Knorpels	$1,64 \pm 0,68$	$1,61 \pm 0,57$	$< 0,001^*$
Mittlerer Gesamtpunktwert	$4,64 \pm 2,97$	$3,89 \pm 2,47$	0,475

Tabelle 15: Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes (nach Goebel *et al.*). Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Bewertung erfolgte anhand des inversen Bewertungssystems (0 Punkte = komplette Knorpelreparatur; 20 Punkte = fehlende Knorpelreparatur) [85].
* Statistisch signifikant versus *lacZ*.

6.4.1.2 Evaluation des Reparaturgewebes nach Smith *et al.*

Die Bewertung der makroskopischen Veränderungen des Reparaturgewebes anhand der Parameter des Bewertungssystems aus Oswestry (nach Smith *et al.* [241], Tabelle 7) zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen des Reparaturgewebes im mittleren Gesamtpunktwert (*lacZ*-behandelte Defekte: $4,29 \pm 2,21$ versus hFGF-2-behandelte Defekte: $4,86 \pm 1,88$; $P = 0,27$). Die individuellen Kategorien des

Defektniveau, der Integration und der Farbe des Defektes zeigten eine Verbesserung der Reparatur der hFGF-2-behandelten Defekte im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe, ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen. Die Beschaffenheit der Oberfläche zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 20, Tabelle 16).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	P-Wert
Defektniveau	1,36 ± 0,83	1,57 ± 0,74	0,33
Integration	0,93 ± 0,54	1,21 ± 0,50	0,07
Oberflächenbeschaffenheit	0,82 ± 0,82	0,82 ± 0,72	0,94
Farbe des Defekts	1,18 ± 0,61	1,25 ± 0,70	0,64
Mittlerer Gesamtpunktwert	4,29 ± 2,21	4,86 ± 1,88	0,27

Tabelle 16: Makroskopische Evaluation des Reparaturgewebes (nach Smith *et al.*). Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Bewertung erfolgte anhand des modifizierten Oswestry Arthroscopy Score (0 Punkte: schlechte Knorpelreparatur; 8 Punkte: gute Knorpelreparatur). * Statistisch signifikant *versus lacZ*.

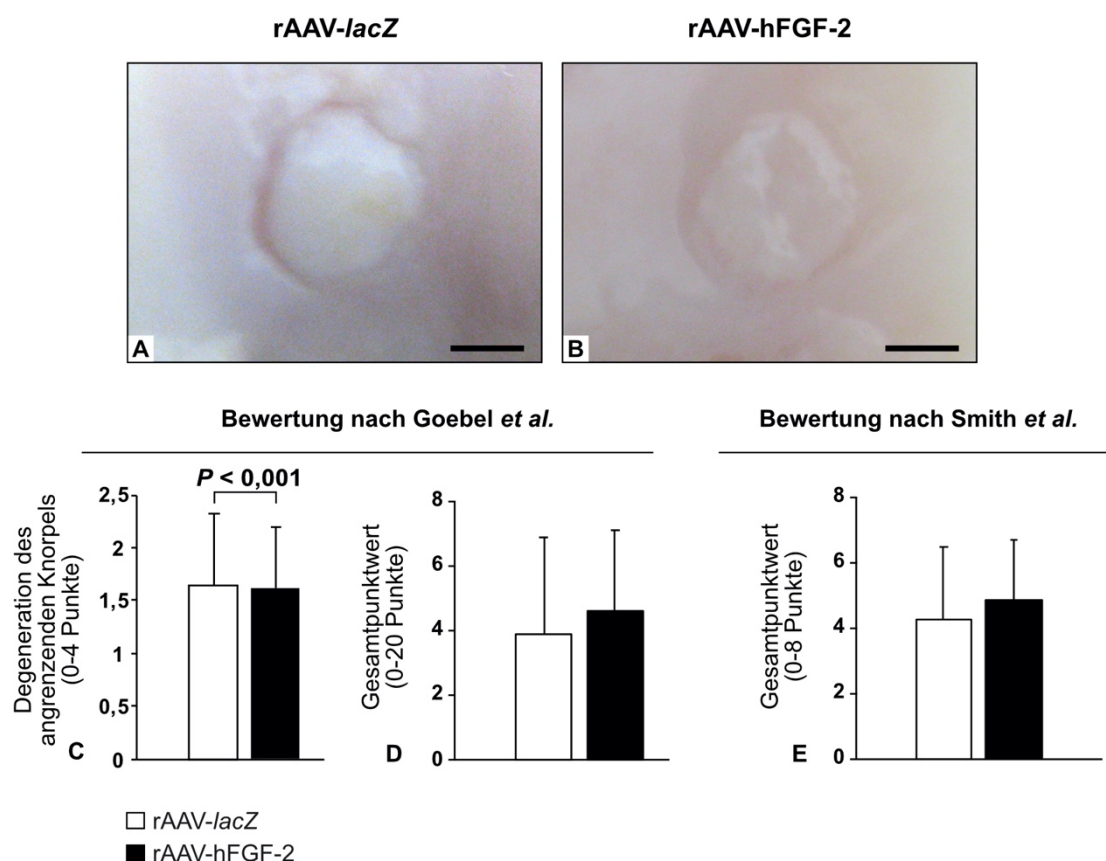


Abbildung 20: Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes. Repräsentative, makroskopische Darstellung der osteochondralen Defekte (A, B). Die Evaluation erfolgte anhand der Bewertungssysteme nach Goebel *et al.* (C) und nach Smith *et al.* (E). Die Punktwerte sind als Balkendiagramme dargestellt. Maßstabsbalken: 1,4 mm.

6.4.2 Histologische Bewertung des Reparaturgewebes

6.4.2.1 Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Safranin O/Echtgrün-gefärbte, histologische Schnitte wurden anhand des in Tabelle 8 beschriebenen, semiquantitativen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [235] evaluiert. Der Gentransfer von hFGF-2 verbesserte signifikant die mittleren Punktwerte für die individuellen Kategorien der Defektfüllung ($P = 0,030$). Im Vergleich zum angrenzenden Knorpel war die Füllung auf annähernd gleichem Niveau. Die Anfärbbarkeit der Knorpelmatrix mit Safranin O/Echtgrün war signifikant verbessert im Vergleich zur *lacZ*-Kontrollgruppe ($P = 0,029$). Auch die Zellmorphologie zeigte eine signifikante Verbesserung ($P = 0,007$) durch vermehrte Anordnung der Zellen in hauptsächlich säulenartiger Orientierung. rAAV-vermittelte Überexpression von hFGF-2 verbesserte außerdem die Punktwerte für die Integration des Defektes in den umgebenden Knorpel (mittlerer Punktwert: $0,94 \pm 0,05$) und Architektur des Defektes (mittlerer Punktwert: $0,39 \pm 0,09$), jeweils ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen. In der Therapiegruppe konnte durchschnittlich 75-100% des subchondralen Knochens neugebildet werden. Die Ausbildung der *tidemark* war im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe verbessert, jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Gegensatz dazu fanden sich keine Unterschiede in den Punktwerten der Architektur der Defektoberfläche (*lacZ*- und hFGF-2-behandelte Defekte: $1,39 \pm 0,09$; $P = 0,918$) (Abbildung 21). Der mittlere Gesamtpunktwert (struktureller Gesamtindex) war für hFGF-2-behandelte Defekte signifikant verbessert ($9,63 \pm 0,20$ versus $12,20 \pm 0,19$ für *lacZ*-Kontrolldefekte; $P < 0,001$) (Abbildung 22). Die Punktwerte für die Kategorie der Neubildung des subchondralen Knochens wurden in die Ermittlung des Gesamtpunktwertes mit einbezogen (Tabelle 17).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	Mittlere Differenz	P-Wert
Defektfüllung	$0,47 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,04$	-0,32	0,030*
Integration	$1,22 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,05$	-0,35	0,084
Matrixanfärbbarkeit	$1,26 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,07$	-0,76	0,029*
Zellmorphologie	$2,14 \pm 0,06$	$1,66 \pm 0,05$	-0,48	0,007*
Defektarchitektur	$0,64 \pm 0,10$	$0,39 \pm 0,09$	-0,25	0,480
Oberflächenarchitektur	$1,39 \pm 0,09$	$1,39 \pm 0,09$	0,00	0,918
<i>tidemark</i>	$3,86 \pm 0,07$	$3,76 \pm 0,06$	-0,10	0,551
Gesamtpunktwert	$12,20 \pm 0,19$	$9,63 \pm 0,20$	-2,57	< 0,001*

Tabelle 17: Gesamtbewertung der histologischen Knorpelreparatur. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben, evaluiert anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* (0 Punkte = komplette Reparatur/normaler Gelenkknorpel; 31 Punkte = keine Reparatur). Die Punktwerte für die Kategorie „Neubildung des subchondralen Knochens“ wurden in die Ermittlung des Gesamtpunktwertes mit einbezogen. * Statistisch signifikant versus *lacZ*.

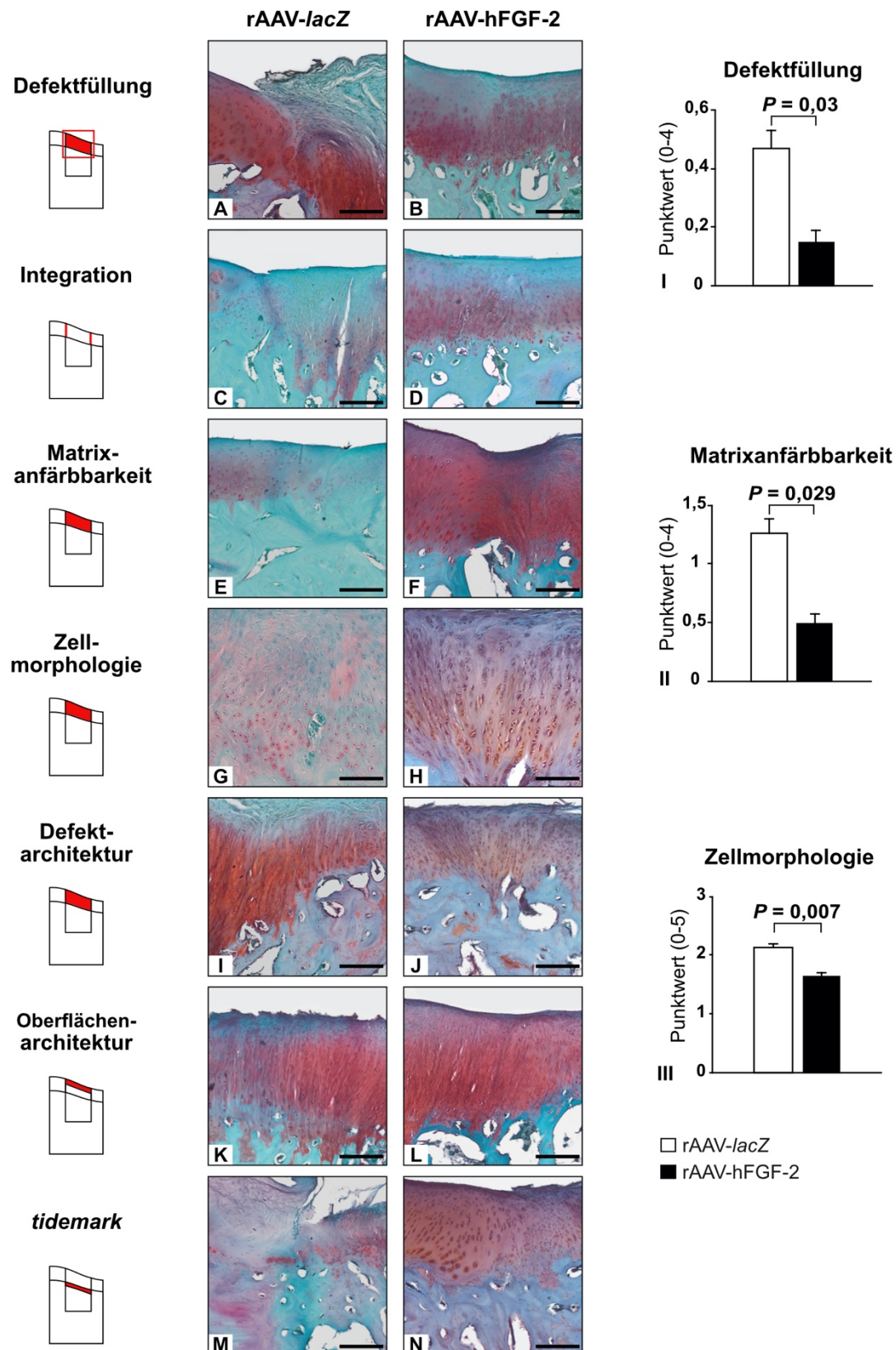


Abbildung 21: Histologische Bewertung des Reparaturgewebes. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte des Reparaturgewebes für rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (A-N). Die Evaluation erfolgte anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.*, die Punktwerte der Kategorien „Defektfüllung“, „Matrixanfärbbarkeit“ und „Zellmorphologie“ sind als Balkendiagramme dargestellt (I-III). Maßstabsbalken: 250 µm, 4-fache Vergrößerung (Ausnahme: G+H: 100 µm, 10-fache Vergrößerung). Safranin O/Echtgrün-Färbung.

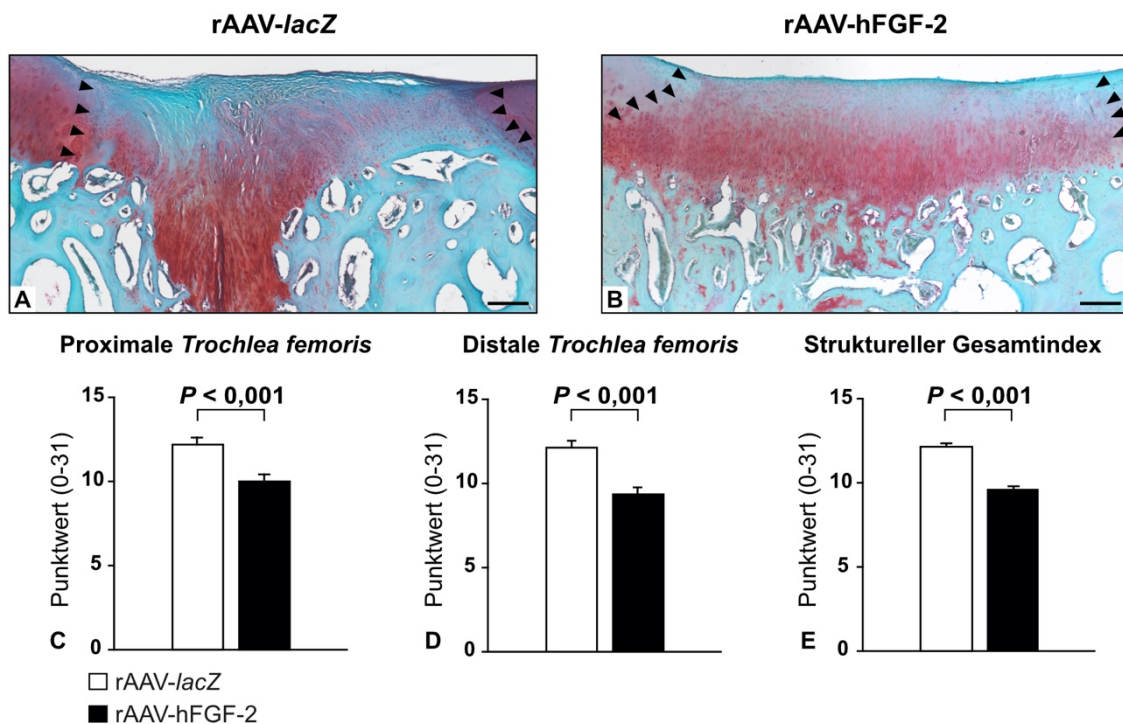


Abbildung 22: Übersicht der Gesamtpunktwerte der histologischen Bewertung. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte des Reparaturgewebes für rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (**A**, **B**). Die Evaluation erfolgte anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* Die Gesamtpunktwerte der einzelnen Regionen der *Trochlea femoris* (**C**, **D**) und der strukturelle Gesamtindex (**E**) der osteochondralen Reparatur sind als Balkendiagramme dargestellt. Maßstabsbalken: 250 μ m, 4-fache Vergrößerung. Safranin O/Echtgrün-Färbung.

6.4.2.2 Vergleich verschiedener Regionen

Zur histologischen Evaluation des Reparaturgewebes anhand des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* [235] verglichen wir auch verschiedene anatomische Lokalisationen miteinander (distale *versus* proximale Anteile der *Trochlea femoris*). Ein signifikant besseres Reparaturpotential von hFGF-2-behandelten Defekten wurde bei der separaten Betrachtung der Gesamtpunktwerte von distalen (lacZ-behandelte Defekte: $12,06 \pm 0,60$ *versus* hFGF-2-behandelte Defekte: $9,30 \pm 0,58$) und proximalen (lacZ-behandelte Defekte: $12,19 \pm 0,44$ *versus* hFGF-2-behandelte Defekte: $10,02 \pm 0,44$) gezeigt. Die Punktwerte für die Kategorie der Neubildung des subchondralen Knochens wurden in die Ermittlung des Gesamtpunktwertes mit einbezogen. Ausschließlich auf der distalen *Trochlea femoris* von hFGF-2-behandelten Defekten konnte eine signifikante Verbesserung der Punktwerte der Defekt- und Oberflächenarchitektur beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Defektintegration ($P = 0,712$) und Neubildung der *tidemark* ($P = 0,202$) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Proximale Aspekte der *Trochlea femoris* zeigten signifikant verbesserte Punktwerte in der Neubildung der *tidemark* ($P < 0,001$). Interessanterweise war die Architektur der

Oberfläche des Reparaturgewebes in der *lacZ*-Kontrollgruppe signifikant verbessert ($P < 0,001$). Die Punktwerte der Defektarchitektur waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen (Tabelle 18 und Tabelle 19).

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	Mittlere Differenz	P-Wert
Defektfüllung	0,58 ± 0,13	0,17 ± 0,13	-0,42	< 0,001*
Integration	1,44 ± 0,17	0,90 ± 0,16	-0,54	< 0,001*
Matrixanfärbbarkeit	1,04 ± 0,17	0,52 ± 0,17	-0,52	< 0,001*
Zellmorphologie	2,08 ± 0,10	1,54 ± 0,10	-0,54	< 0,001*
Defektarchitektur	0,62 ± 0,31	0,60 ± 0,30	-0,02	0,916
Oberflächenarchitektur	1,17 ± 0,28	1,71 ± 0,29	0,54	< 0,001*
<i>tidemark</i>	3,96 ± 0,17	3,60 ± 0,17	-0,36	< 0,001*
Gesamtpunktwert	12,19 ± 0,44	10,02 ± 0,44	-2,17	< 0,001*

Tabelle 18: Histologische Bewertung der proximalen *Trochlea femoris*. Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben, evaluiert anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* (0 Punkte = komplette Reparatur/normaler Gelenkknorpel; 31 Punkte = keine Reparatur). Die Punktwerte für die Kategorie „Neubildung des subchondralen Knochens“ wurden in die Ermittlung des Gesamtpunktwertes mit einbezogen. * Statistisch signifikant *versus lacZ*.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hFGF-2	Mittlere Differenz	P-Wert
Defektfüllung	0,34 ± 0,13	0,14 ± 0,13	-0,19	0,042 *
Integration	0,98 ± 0,06	1,00 ± 0,07	0,02	0,712
Matrixanfärbbarkeit	1,47 ± 0,27	0,48 ± 0,26	-0,99	< 0,001*
Zellmorphologie	2,03 ± 0,20	1,77 ± 0,19	-0,26	0,003*
Defektarchitektur	0,66 ± 0,13	0,21 ± 0,12	-0,45	< 0,001*
Oberflächenarchitektur	1,67 ± 0,22	1,13 ± 0,21	-0,54	< 0,001*
<i>tidemark</i>	3,73 ± 0,13	3,89 ± 0,12	0,16	0,202
Gesamtpunktwert	12,06 ± 0,60	9,30 ± 0,58	-2,76	< 0,001*

Tabelle 19: Histologische Bewertung der distalen *Trochlea femoris*. Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben, evaluiert anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* (0 Punkte = komplette Reparatur/normaler Gelenkknorpel; 31 Punkte = keine Reparatur). Die Punktwerte für die Kategorie „Neubildung des subchondralen Knochens“ wurden in die Ermittlung des Gesamtpunktwertes mit einbezogen. * Statistisch signifikant *versus lacZ*.

6.4.3 Zelldichte

Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung der histologischen Schnitte ermittelten wir die Zelldichte von rAAV-hFGF-2-behandelten Defekten im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-behandelten Kontrollgruppe. In den Knorpeldefekten zeigte sich in der kumulativen Betrachtung der zwei Zonen eine signifikant höhere Zelldichte ($P = 0,049$) für hFGF-2-behandelte Defekte ($770 \pm 153,38$ Zellen pro mm^2) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($471,5 \pm 100,52$ Zellen pro mm^2). In der Betrachtung der zentralen Zone ergab sich eine höhere Zelldichte für die Therapiegruppe (hFGF-2-behandelte Defekte: 865 ± 110 Zellen pro mm^2 *versus lacZ*-Kontrolldefekte: $432,5 \pm 17,5$ Zellen pro mm^2) ohne das statistische

Signifikanzniveau zu erreichen ($P = 0,06$). Dies zeigte sich ebenfalls in Betrachtung der peripheren Zone (hFGF-2-behandelte Defekte: 675 ± 130 Zellen pro mm^2 versus *lacZ*-Kontrolldefekte: 510 ± 130 Zellen pro mm^2 ; $P = 0,464$). Keinen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich der peripheren und zentralen Zone der einzelnen Therapiegruppen (hFGF-2-behandelte Defekte: $P = 0,380$; *lacZ*-Kontrolldefekte: $P = 0,614$) (Abbildung 23).

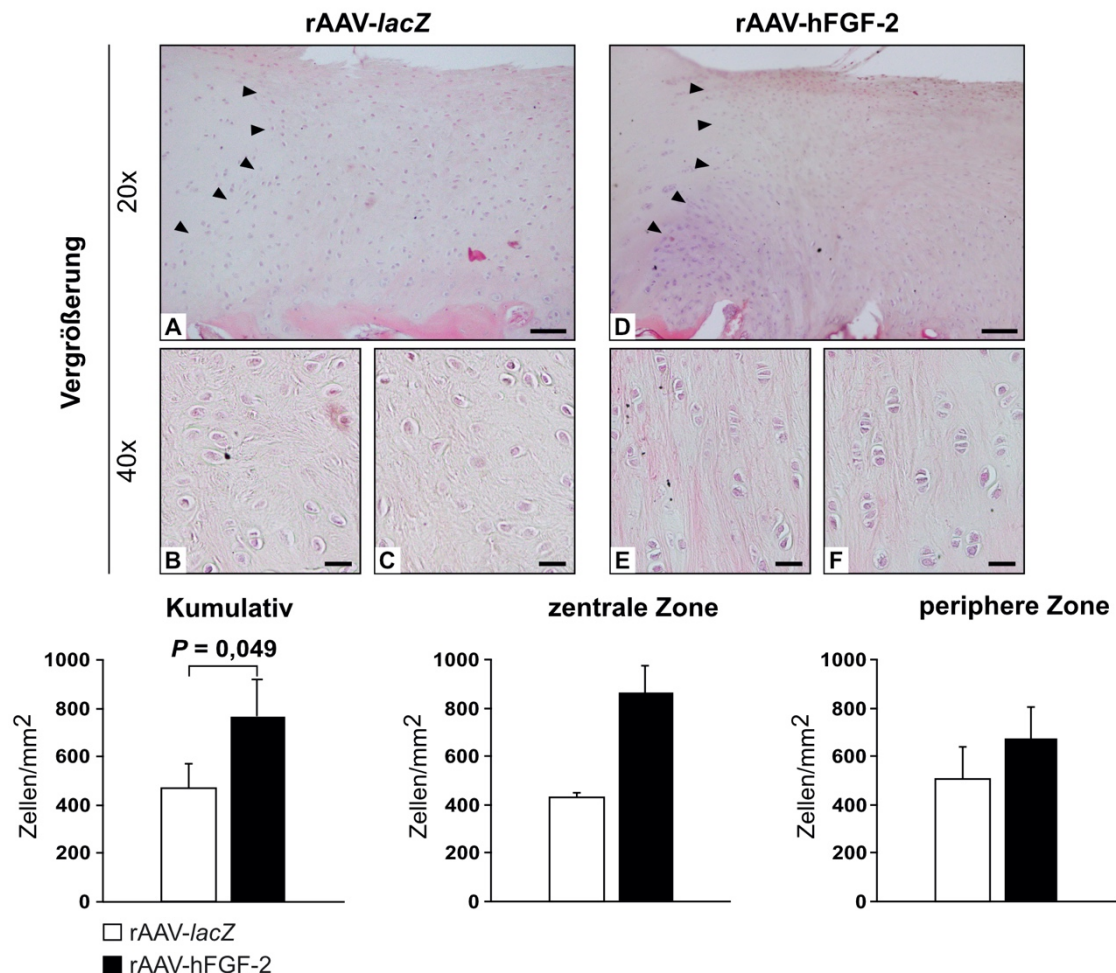


Abbildung 23: Bestimmung der Zelldichte. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte des Reparaturgewebes für rAAV-*lacZ* und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (A-F), anhand derer die Zelldichte bestimmt wurde (20-fache Vergrößerung). B und E: periphere Zone; C und F: zentrale Zone der jeweiligen Gruppe (40-fache Vergrößerung). Die Werte der einzelnen Zonen sind als Balkendiagramme dargestellt. Maßstabbalken: 100 μm für A, D; 20 μm für B, C, E, F. Die Pfeile markieren die Integrationszone in den Übersichtsausschnitten (A, D). Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

6.4.4 Typ-II- und Typ-I-Kollagenexpression

Die Immunreaktivität von Typ-II- und Typ-I-Kollagen entspricht der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung und ist Ausdruck der Typ-II- und Typ-I-Kollagenexpression. Zur Beurteilung der Typ-I- und Typ-II-Immunreaktivität des Reparaturgewebes wendeten wir ein semiquantitatives Bewertungssystem an [203]. Die

Applikation von rAAV-hFGF-2 zeigte eine signifikant stärkere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen ($3,00 \pm 0,15$; 1,3-facher Unterschied) im Vergleich zur Kontrollgruppe nach rAAV-*lacZ*-Behandlung ($2,29 \pm 0,27$; $P = 0,020$). Ergänzend war die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen für hFGF-2-behandelte Defekte signifikant reduziert ($1,29 \pm 0,13$; $P \leq 0,0001$) im Vergleich zu *lacZ*-Kontrolldefekten ($1,57 \pm 0,14$; 1,2-facher Unterschied). In der Polarisationsmikroskopie stellte sich das Kollagennetzwerk in hFGF-2-behandelten Defekten einheitlicher dar als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig wurden die Kollagenfibrillen beider Gruppen nicht im umgebenden Knorpel reproduziert (Abbildung 24).

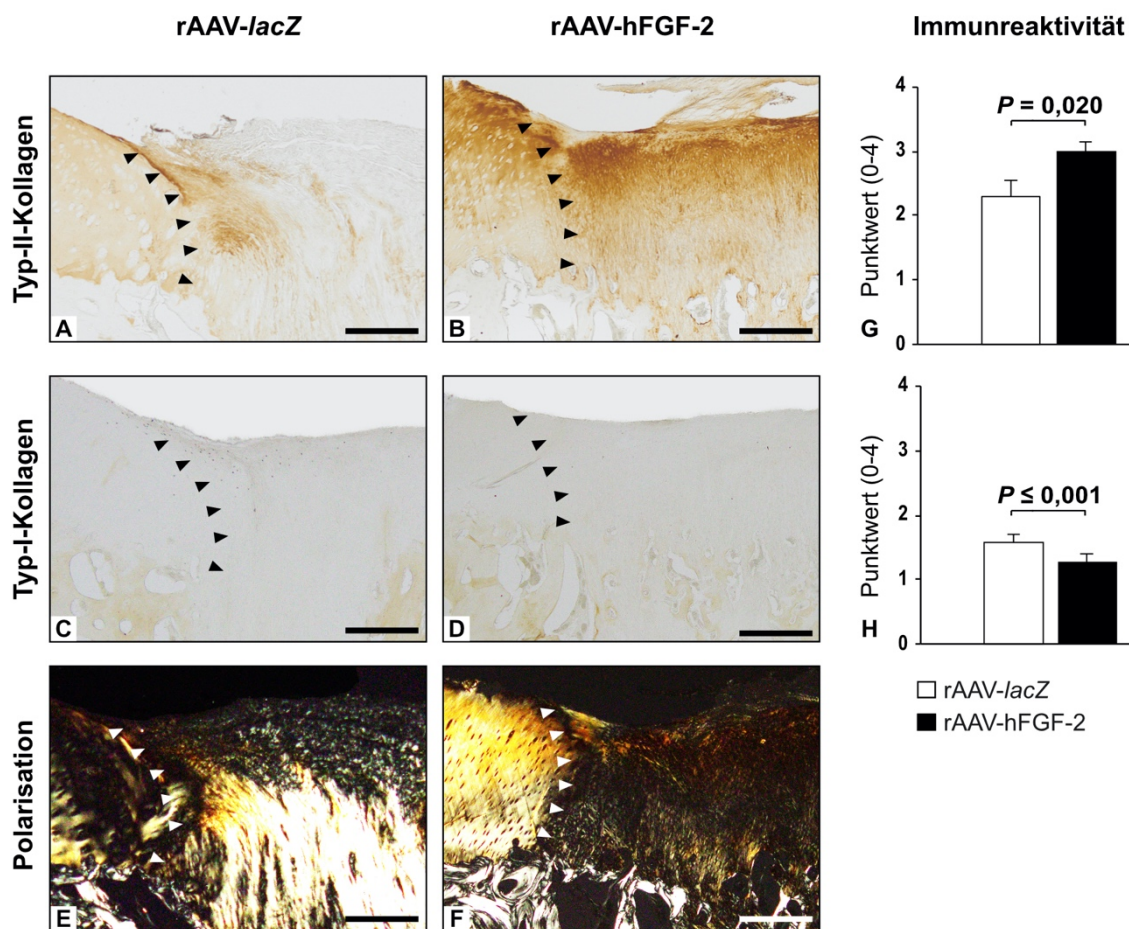


Abbildung 24: Immunhistologischer Nachweis der Typ-I- und II-Kollagenexpression. Darstellung repräsentativer histologischer Schnitte des Reparaturgewebes für rAAV-*lacZ* und rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte (A-F). Die Evaluation erfolgte anhand eines semiquantitativen Bewertungssystems [203] nach Färbung mit einem monoklonalen Anti-Typ-II-Kollagen IgG (A, B) oder Anti-Typ-I-Kollagen IgG (C, D). Die Polarisationsmikroskopie stellt das Kollagennetzwerk der Defekte und des angrenzenden Gelenkknorpels dar (E, F). Die mittleren Gesamtpunktwerte sind als Balkendiagramme dargestellt (G, H). Maßstabsbalken: 250 μ m, 4-fache Vergrößerung.

6.4.5 Biochemische Auswertung

Wir analysierten das knorpelige Reparaturgewebe von rAAV-hFGF-2- und rAAV-*lacZ*-behandelten Defekten sowie das umliegende Knorpelgewebe mit Hilfe biochemischer Methoden. Der DNS-Gehalt (= Zellzahl) im Reparaturgewebe der Defekte war in der rAAV-hFGF-2-behandelten Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 1,05-fache erhöht ($P = 0,229$). In Betrachtung des angrenzenden Knorpels war der DNS-Gehalt in der hFGF-2-behandelten Gruppe um das 2,06-fache signifikant erhöht ($P = 0,007$) im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe. Der Proteoglykangehalt war in den hFGF-2-behandelten Defekten und des angrenzenden Knorpels der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen (P jeweils $> 0,05$). Das Proteoglykan/DNS-Verhältnis war in den Defekten für *lacZ*- und hFGF-2-behandelte Defekte ausgeglichen (jeweils $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{ng}$). Auch in Betrachtung des angrenzenden Knorpels fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Proteoglykan/DNS-Verhältnis ($P = 0,098$) (Tabelle 20). Vergleicht man Reparaturknorpel und angrenzenden Knorpel innerhalb der FGF-2-behandelten Therapiegruppe und *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe, so ergaben sich Differenzen (Tabelle 21). Die Zellzahl (DNS-Gehalt) im Reparaturknorpel der *lacZ*-Kontrollgruppe war im Vergleich zum angrenzenden Knorpel signifikant erhöht (*lacZ*-Defekt: $4,13 \pm 0,80 \text{ ng}/\mu\text{g}$ versus *lacZ*-angrenzender Knorpel: $2,0 \pm 0,37 \text{ ng}/\mu\text{g}$; $P = 0,007$). Ebenso war das Proteoglykan/DNS-Verhältnis der *lacZ*-behandelten Defekte im Vergleich zum angrenzenden Knorpel signifikant erniedrigt ($0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{ng}$ versus $0,13 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{ng}$; $P = 0,001$). Die Matrixsynthese (Proteoglykangehalt) war im Reparaturknorpel der *lacZ*-Kontrollgruppe im Vergleich zum umgebenden Knorpel nicht signifikant erhöht (*lacZ*-Defekt: $0,27 \pm 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ versus *lacZ*-angrenzender Knorpel: $0,25 \pm 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{g}$; $P = 0,214$). In der hFGF-2-behandelten Therapiegruppe zeigte sich eine erhöhte Zellzahl in der Defektzone ($4,36 \pm 0,64 \text{ ng}/\mu\text{g}$) verglichen mit dem umgebenden Knorpel ($4,12 \pm 1,43 \text{ ng}/\mu\text{g}$). Der Gehalt an Proteoglykanen war im angrenzenden Knorpel leicht erhöht (hFGF-2-Defekt: $0,30 \pm 0,06$ versus hFGF-2-angrenzender Knorpel: $0,41 \pm 0,39$). Das Proteoglykan/DNS-Verhältnis war balanciert zwischen den beiden Zonen (hFGF-2-Defekt: $0,07 \pm 0,01$ versus hFGF-2-angrenzender Knorpel: $0,09 \pm 0,05$). Der Vergleich der Defekt- und angrenzenden Zone innerhalb der hFGF-2-behandelten Gruppe zeigte jeweils keinen signifikanten Unterschied bezüglich DNS- und Proteoglykangehalt sowie Proteoglykan/DNS-Verhältnis (Abbildung 25).

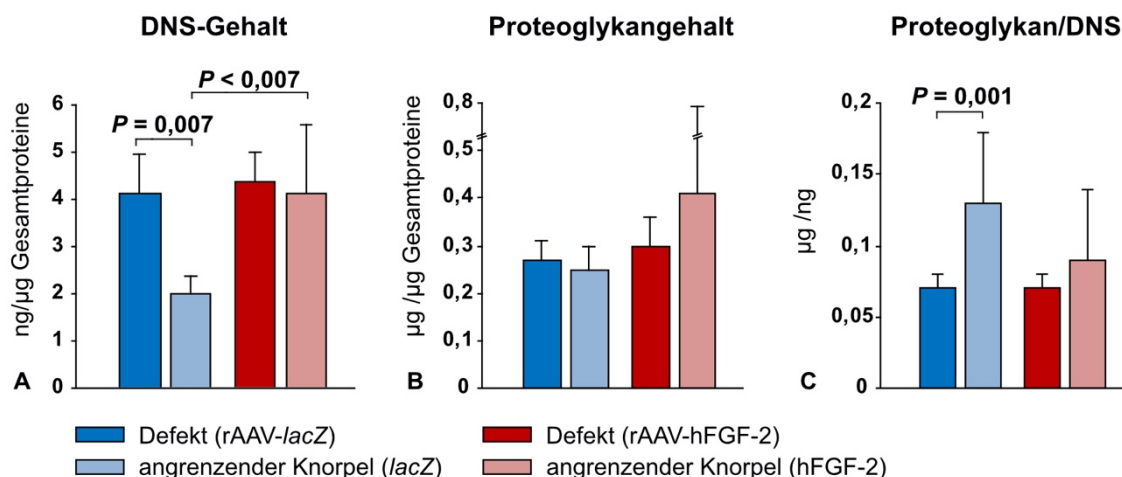


Abbildung 25: Biochemische Auswertung. DNS (A)- und Proteoglykangehalt (B) sowie Proteoglykan/DNS-Verhältnisse (C) wurden für das Reparaturgewebe von rAAV-lacZ und rAAV-hFGF-2-behandelten Defekte sowie für den angrenzenden Knorpel analysiert. Darstellung als Balkendiagramme.

Parameter	rAAV-behandelte Defekte		Angrenzender Knorpel		P-Werte	
	lacZ	hFGF-2	lacZ	hFGF-2	(a)	(b)
DNS-Gehalt (ng/μg Gesamtproteine)	4,13 ± 0,80	4,36 ± 0,63	2,00 ± 0,37	4,12 ± 1,43	0,229	0,007*
Proteoglykangehalt (μg/μg Gesamtproteine)	0,27 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,41 ± 0,39	0,120	0,204
Proteoglykan/DNS (μg/ng)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,09 ± 0,05	0,399	0,098

Tabelle 20: Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes und des angrenzenden Knorpels. Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Statistische Vergleiche: (a) hFGF-2 versus lacZ (Defekte), (b) hFGF-2 versus lacZ (angrenzender Knorpel). * Statistisch signifikante Gruppen.

Parameter	P-Werte	
	lacZ	hFGF-2
	Defekt versus angrenzender Knorpel	Defekt versus angrenzender Knorpel
DNS-Gehalt (ng/μg Gesamtproteine)	< 0,007 *	0,338
Proteoglykangehalt (μg/μg Gesamtproteine)	0,214	0,229
Proteoglykan/DNS (μg/ng)	0,001 *	0,165

Tabelle 21: Statistischer Vergleich der biochemischen Auswertung. Verglichen wurden rAAV-lacZ-behandelte Defekte versus angrenzender Knorpel, analog rAAV-hFGF-2-behandelte Defekte versus angrenzender Knorpel. * Statistisch signifikante Gruppen.

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die übergeordnete Hypothese, ob direkter Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren die osteochondrale Reparatur *in vivo* im Großtiermodell verbessert. Aus den Daten der Studie gehen einige wichtige Erkenntnisse hervor.

Die erste Feststellung ist, dass eine effektive und prolongierte hFGF-2-Überexpression *in vivo* über einen Zeitraum von 6 Monaten erfolgreich aufrechterhalten werden konnte. Diesen Aspekt wiesen wir durch eine signifikant stärkere anti-hFGF-2-Immunreaktivität im knorpeligen Reparaturgewebe von Defekten, die mit rAAV-hFGF-2 behandelt wurden als in rAAV-*lacZ*-behandelten Kontroll-Defekten nach. Der verwendete rAAV-Genvektor eignet sich aufgrund seiner langen Verfügbarkeit daher als möglicher Kandidat in der Therapie osteochondraler Defekte [186]. Dieser Aspekt ergänzt Erkenntnisse aus einer Studie am Kleintiermodell, in welcher ein effektiver rAAV-Gentransfer nach 4 Monaten nachgewiesen werden konnte [40].

Die zweite wichtige Feststellung ist, dass rAAV-vermittelte hFGF-2 Überexpression eine verbesserte histologische subchondrale Reparatur im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe aufzeigte. Die mikrostrukturellen Daten demonstrieren, dass dabei hauptsächlich die Reparatur der subchondrale Knochenplatte beeinflusst wurde. Dies zeigt sich vor allem durch den höheren und damit „normaleren“ Knochenvolumenanteil (BV/TV) von rAAV-hFGF-2-behandelten Defekten.

Der wichtigste Aspekt dieser Studie ist der signifikant verbesserte histologische Gesamtpunktwert der osteochondralen Reparatur in Defekten, die mit rAAV-hFGF-2 behandelt wurden. Die rAAV-hFGF-2 Therapie verbesserte ebenfalls signifikant die individuellen Parameter „Defektfüllung“, „Matrixanfärbbarkeit“ und „Zellmorphologie“ des histologischen inversen Bewertungssystems [235], jeweils im Vergleich zur *lacZ*-Kontrollgruppe. Die rAAV-vermittelte Überexpression von hFGF-2 steigerte ebenfalls signifikant die Zelldichte im knorpeligen Reparaturgewebe im Vergleich zu Kontroll-Defekten. Es ist außerdem hervorzuheben, dass nach makroskopischer Bewertung der osteochondralen Defekte eine signifikant verminderte perifokale Arthrose vorlag. Die rAAV-vermittelte Überexpression von hFGF-2 führte zu einer signifikant stärkeren Produktion von Typ-II-Kollagen bei gleichzeitiger signifikant niedrigeren Produktion von Typ-I-Kollagen im knorpeligen Reparaturgewebe.

7.1 Wirkung des rAAV-basierten Gentransfers auf das Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten

7.1.1 Effekte auf die makroskopischen und histologischen Parameter der Knorpelreparatur

Zunächst wurde die Hypothese untersucht, ob rAAV-vermittelter Gentransfer von humanem FGF-2 im Reparaturgewebe die Parameter der makroskopischen und histologischen Bewertungssystemen im Vergleich zur *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe verbessert. Die makroskopischen Analysen durch zwei unabhängige Bewertungssysteme [85,241] zeigten numerische Verbesserungen individueller Parameter sowie des jeweiligen mittleren Gesamtpunktwertes. Die „Farbe des Reparaturgewebes“ wurde in beiden Bewertungssystemen evaluiert und demonstrierte eine Ähnlichkeit zum normalen Knorpelgewebe. Ebenso zeigte die „Füllung des Defektes“ bzw. das „Defektniveau“ eine komplette Füllung des Defektes mit Reparaturgewebe in beiden Gruppen. Auch die „Beschaffenheit der Oberfläche“ wurde in beiden Bewertungssystemen betrachtet. Ein numerischer Unterschied konnte hier lediglich im Bewertungssystem nach Goebel und Mitarbeitern festgestellt werden. Ergänzend wurde in diesem Bewertungssystem auch das Vorkommen von Blutgefäßen beurteilt. Eine vermehrte Ausbildung von Blutgefäßen wurde in keiner der Gruppen beobachtet. Normalerweise ist der Gelenkknorpel des Erwachsenen avaskulär [187]. Eine Angiogenese tritt in der osteochondralen Einheit als Zeichen einer Arthrose auf. In fortgeschrittenen Stadien der Arthrose penetrieren die Blutgefäße dabei die *tidemark* und treten an die Oberfläche [20]. Interessanterweise traten in *lacZ*-behandelten Defekten vermehrte Anzeichen einer Degeneration des angrenzenden Knorpels auf. Im Bewertungssystem aus *Oswestry* wird der angrenzende Knorpel nicht beurteilt. Hiraide *et al.* zeigten im Kleintiermodell eine signifikante Verbesserung des Gesamtpunktwertes eines semiquantitativen, makroskopischen Bewertungssystems nach AAV-assoziiertem Gentransfer von bovinem (b)FGF-2 in chondrale Defekte [105]. Der angrenzende Knorpel wurde, im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, nicht als eigenständige Kategorie analysiert und das Vorkommen von Blutgefäßen wurde nicht bewertet [132]. Madry und Mitarbeiter überexprimierten erfolgreich den Transkriptionsfaktor SOX9 rAAV-vermittelt und via hydrogelbasierter Biomaterialien in vollschichtigen, chondralen Defekten. Die Studie wurde am Minischwein-Modell durchgeführt. Die makroskopische Analyse anhand des Bewertungssystems nach Goebel *et al.* zeigte hier eine signifikante Verbesserung des Gesamtpunktwertes sowie ein signifikant geringeres Vorkommen von Blutgefäßen [165]. Ähnliche Verbesserungen der Knorpelreparatur stellten Cucchiari *et al.* nach Überexpression von rAAV-TGF- β in osteochondralen Defekten am

Minischwein-Modell fest. In dieser Studie wurde auch das Bewertungssystem aus *Oswestry* in die makroskopische Bewertung mit einbezogen [51]. Die rAAV-vermittelte Überexpression verschiedener therapeutischer Faktoren zeigt somit im Großtiermodell unterschiedliche makroskopische Effekte.

Die wichtigste Feststellung der durchgeführten Studie waren signifikant verbesserte, individuelle histologische Parameter der Knorpelreparatur nach Auswertung anhand des inversen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* [235]. Hier zeigten sich signifikante Verbesserung nach rAAV-vermitteltem Gentransfer von hFGF-2 im individuellen Parameter der „Defektfüllung“. Die bessere Füllung der hFGF-2- behandelten Defekte wurde bereits am Kleintiermodell durch Cucchiari *et al.* beobachtet [40]. In der genannten Studie sowie in der vorliegenden Untersuchung war die „Zellmorphologie“ zugunsten der Therapiegruppe verbessert. Nach hFGF-2-Behandlung entstanden vermehrt runde Zellen mit chondrogenem Phänotyp und säulenartiger Anordnung im Reparaturgewebe. Dies bestätigt die Rolle von hFGF-2 als mitogen wirkender Faktor [146]. Als Zeichen einer vermehrten Proteoglykanbildung beobachteten wir eine signifikant vermehrte „Matrixanfärbbarkeit“ in der Therapiegruppe. Gleichzeitig war der mittlere Gesamtpunktwert im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert. Nach quantitativer Analyse zeigte sich außerdem eine signifikant höhere Zelldichte nach rAAV-hFGF-2-Gabe im Vergleich zur *lacZ*-Behandlung. Diese Feststellung stimmt mit den zellproliferativen Eigenschaften von FGF-2 überein [123,252]. Vergleicht man die unterschiedlichen Lokalisationen der gesetzten Defekte (distale *Trochlea femoris* und proximale *Trochlea femoris*) nach histologischen Gesichtspunkten, zeigten sich jeweils signifikant verbesserte mittlere Gesamtpunktwerte der Therapiegruppe. Gleichzeitig waren jedoch auch unterschiedliche individuelle Parameter der histologischen Knorpelreparatur signifikant verbessert. Die Verwendung histologischer, semiquantitativer Bewertungssysteme gilt als Goldstandard für die Bewertung von knorpeligen Reparaturgewebe [206]. Auch ähnliche Studien am Großtiermodell, in denen rAAV-vermittelt eine Überexpression von therapeutischen Faktoren stattfand, zeigten nach histologischer Bewertung nach Sellers *et al.* signifikante Unterschiede im Gesamtpunktwert und in einzelnen Kategorien im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe [9,51,165]. Die Auswertung erfolgte hier jedoch bereits nach einem Zeitraum von vier Wochen. Eine Verbesserung der Knorpelreparatur, betrachtet nach histologischen Aspekten [261], konnten Hiraide und Mitarbeiter am Kleintiermodell nach bFGF-2-Überexpression in chondralen Defekten feststellen [105]. Limitierend war in dieser Studie ebenfalls der maximale Beobachtungszeitraum von 12 Wochen. Der FGF-2-Transfer mit Hilfe einer Kollagenmembran in osteochondrale Defekte zeigte am

Kleintiermodell einen Effekt auf den subchondralen Knochen sowie die Gesamtreparatur des Knorpels nach 8 Wochen *in vivo* [272], evaluiert anhand eines kumulativen Bewertungssystems [95]. Ein Gentransfer fand in dieser Studie nicht statt.

Zusammenfassend gelang die Expression von hFGF-2 via rAAV erfolgreich und war im Vergleich zum *lacZ*-Kontrollgentransfer in der Lage, mikroskopische (histologische) Reparaturprozesse in den Defekten nach sechs Monaten zu verbessern. Nachteilige Effekte (Synovitis, Infektionen, Fibrosen, Osteophytenbildung) zeigen sich nicht. Eine Vektor-Leckage tritt praktisch nicht auf. Dies ist am Ehesten durch den gewählten chirurgischen Zugangsweg (Arthrotomie) zu erklären. Zuvor veröffentlichte Studien am Kaninchen zeigten bereits, dass rAAV-Vektoren geeignete Vektortypen sind, um spezifische therapeutische Faktoren auf chirurgischem Weg in Defekte einzubringen [40,105].

7.1.2 Effekte auf die Zellproliferation und Histomorphologie

In unbehandelten Defektarealen kommt es zu einer spontanen Zunahme des Typ-II-Kollagengehaltes [123,196]. Der positive Nachweis von Typ-II-Kollagen in *lacZ*-behandelten Defekten beweist, dass rAAV-Gentransfersysteme auch ohne Wachstumsfaktorübertragung die Typ-II-Kollagenproduktion stimulieren. Sie dienen als Grundlage der Chondrogenese. Durch die Ausrichtung von Kollagenfibrillen wird dem Gelenkknorpel seine Form verliehen [28]. Dieses Netzwerk wird durch die Polarisationsmikroskopie visualisiert und ist in *lacZ*- sowie hFGF-2-behandelten Defekten gut ausgeprägt. Interessanterweise ist der Typ-II-Kollagennachweis in rAAV-hFGF-2-behandelten Defekten in den immunhistochemischen Analysen signifikant erhöht. Das Kollagenetzwerk dient den Chondrozyten als Gerüst und ist Voraussetzung für die Synthese von Matrixbestandteilen [28,100,193]. Entsprechend in Einklang bringen lässt sich diese Beobachtung mit der signifikanten Verbesserung der histologischen Strukturparameter in hFGF-2-behandelten Defekten in unterschiedlichen Lokalisationen getrennt- sowie kumulativ betrachtet (Verbesserung der Punktwerte für „Matrixanfärbbarkeit“ und „Zellmorphologie“). Der Typ-I-Kollagengehalt ist typischerweise im subchondralen Knochen erhöht [156] und findet sich auch im fibrösem Reparaturknorpel [222]. Er dient als knochenbildender Marker [44]. In beiden Gruppen stellten wir Typ-I-Kollagen im knorpeligen Reparaturgewebe fest, ein fibrotischer Anteil des Reparaturgewebes bleibt demnach bestehen. Die Regeneration von gesundem, hyalinem Gelenkknorpel war nicht vollständig möglich. Zu diskutieren ist jedoch auch der

positive Nachweis von Typ-I-Kollagen durch die erhöhte mechanische Belastung der gesetzten Defekte unmittelbar postoperativ. Eine Entlastung der operierten Extremität, wie nach klinisch angewandten Knorpeltherapien, konnte beim Versuchstier nicht durchgeführt werden. Orth *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die Kollagensynthese möglicherweise den untersuchten Zeitraum von sechs Monaten überdauert und eine abschließende Beurteilung der Kollagensynthese noch nicht getroffen werden kann [198]. Dennoch ist der immunhistochemische Nachweis von Typ-I-Kollagen in hFGF-2-behandelten Defekten signifikant geringer als in der *lacZ*-behandelten Kontrollgruppe. Die signifikant erhöhte Zelldichte in hFGF-2-behandelten Defekten unterstreicht nochmals die zellproliferative Eigenschaft des verwendeten therapeutischen Faktors. Keinen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich einer zentralen und peripheren Zone innerhalb des Defektes der beiden Gruppen. Dies zeigt, dass die eingebrachte rAAV-Lösung innerhalb des Defektes ohne zusätzliche Modifikation durch Biomaterialien gleich verteilt wirkte. Diese Erkenntnis kann auch als biologische Reaktion des Gewebes auf die Knorpelverletzung zurückgeführt werden.

Insgesamt sind sowohl die Stimulation von reparativen Zellaktivitäten in Gegenwart von rAAV-hFGF-2 (Steigerung der Zellproliferation und des Typ-II-Kollagengehalt) als auch die gleichzeitige Abnahme der unerwünschten Typ-I-Kollagenexpression als positiv für die Knorpelreparatur zu sehen und stimmen mit den Eigenschaften dieses Wachstumsfaktors in zuvor veröffentlichten Studien überein [209,252]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien am Kleintiermodell [40,105].

7.1.3 Effekt auf die biochemischen Eigenschaften

Der DNS- und Proteoglykangehalt war im Reparaturgewebe von hFGF-2-behandelten Defekten im Vergleich zur Kontrollgruppe nach den biochemischen Analysen erhöht. Dies kann als stimulierte Zellaktivierung verstanden werden und ist gut mit den histomorphologischen Beobachtungen vereinbar. Im angrenzenden, normalen Knorpelgewebe war der DNS-Gehalt und damit die Zellzahl der *lacZ*-behandelten Gruppe signifikant vermindert. Hier sind vorwiegend ruhende, nicht-proliferative Zellen zu finden welche von der Verletzung in der Defektzone nicht beeinflusst wurden. Auch der rAAV-Transfer ohne Wachstumsfaktor induzierte keine spontane Zellproliferation im benachbarten Knorpel. Dies wird durch ein ausgeglichenes Proteoglykan/DNS-Verhältnis im angrenzenden Knorpel unterstrichen. Interessanterweise war die Zellzahl im benachbarten, normalen Knorpel von hFGF-2-behandelten Defekten signifikant

erhöht im Vergleich zum benachbarten Knorpel von *lacZ*-behandelten Defekten. Auch der Proteoglykangehalt war hier leicht vermehrt. Eine zellproliferative Wirkung des rAAV-vermittelten Gentransfers von hFGF-2 auf den benachbarten Knorpel ist nicht auszuschließen. *In vitro*-Untersuchungen von rAAV-vermittelter Expression von hFGF-2 in Chondrozyten von Kaninchen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem totalen Proteoglykangehalt nach 26 Tagen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe [40].

Insgesamt war der DNS-Gehalt im Reparaturknorpel der hFGF-2-behandelten Defekte im Vergleich zum angrenzenden Knorpel erhöht, gleichzeitig der Proteoglykangehalt leicht erniedrigt. Dies kann als Anhalt für eine Inaktivität der Proteoglykan-Produktion nach sechs Monaten gesehen werden. Die Stimulation der Proteoglykan-Produktion durch rAAV-hFGF-2 trägt, zusammen mit der Steigerung der Proliferation und Typ-II-Kollagenexpression, zu einer Steigerung der reparativen zellulären Aktivität bei.

7.1.4 Effekt auf die Reparatur des subchondralen Knochens

Die Wiederherstellung des subchondralen Knochens ist unabdingbar für die osteochondralen Reparatur [118,156,204]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine möglichst physiologische Rekonstitution des subchondralen Knochens nach rAAV-vermitteltem Gentransfer von hFGF-2 zu erzielen. Im Minischwein-Modell konnte TGF- β 1 erfolgreich mit Hilfe einer Trägersubstanz in osteochondrale Defekte eingebracht werden [9]. Die Bewertung des subchondralen Knochens durch das Mikro-CT zeigte auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Jedoch fanden sich in dieser Studie bei einigen mikrostrukturellen Parametern signifikante Differenzen zwischen Defekten, welche die Trägersubstanz enthielten und der normalen osteochondralen Einheit.

Die semiquantitative, histologische Bewertung des subchondralen Knochens [235] war signifikant in einzelner Betrachtung der proximalen und distalen Abschnitte der *Trochlea femoris* nach hFGF-2 Verabreichung verbessert. Interessanterweise zeigte sich kein solcher Effekt in einer vorangegangenen Studie am Kaninchenmodell, bei welcher die Applikation von rAAV-FGF-2 nach 4 Monaten ausgewertet wurde [40]. In einer vergleichbar aufgebauten Studie zeigte die Transplantation von FGF-2-überexprimierenden Chondrozyten nach 3 Wochen eine signifikant verbesserte Rekonstruktion des subchondralen Knochens und eine stimulierte Chondrogenese

[123]. Der kombinierte Gentransfer von IGF-I und FGF-2 im Kaninchenmodell zeigte ebenfalls signifikante Verbesserungen der histologischen Rekonstitution des subchondralen Knochens [197]. In einer weiteren Studie wurde FGF-2 durch eine Typ-I/III-Kollagenmembran in vollschichtige Knorpeldefekte von Kaninchen eingebracht. Hier war, nach histologischer Analyse, das *Remodelling* des angrenzenden subchondralen Knochens verbessert [95]. Eine verbesserte Reparatur des subchondralen Knochens fand man außerdem am Kaninchenmodell nach Applikation von rekombinanten FGF-2 (rFGF-2) nach 8 Wochen [37,106,181]. Die Evaluation dieser Studien basierte hauptsächlich auf histologischen Analysen während in unserer Studie die sensitive mikro-computertomografische Methode gewählt wurde. Oben genannte Autoren führten rFGF-2 zuvor gesetzten Defekten mit Hilfe einer osmotischen Pumpe (50-150 pg/h) über 2 Wochen zu, während in unsere Studie eine einzelne, niedrige Vektordosis appliziert wurde ($2,4 \times 10^5$ funktionelle Partikel). Diese Vektorengabe produzierte ca. $40 \cdot 10^{-2}$ pg FGF-2/ml/24 h, dies entspricht einem 3,8- bis 15×10^3 -facher Unterschied [40,44,51].

In unserer Arbeit wurde der subchondrale Knochen zusätzlich zur histologischen Bewertung auch durch das sensitive Mikro-CT analysiert. Es fanden sich unter den getesteten Bedingungen dieser Studie (Vektordosis, Zeitpunkt der Analyse) keine signifikanten Unterschiede zwischen hFGF-2-behandelten Defekten und *lacZ*-behandelten Kontrolldefekten nach mikro-computertomographischer Auswertung in differenzierter Betrachtung der subchondralen Knochenplatte sowie der subartikulären Spongiosa. Interessanterweise zeigte die Analyse des rAAV-FGF-2-behandelten Abschnittes der subchondralen Knochenplatte keine signifikanten Unterschiede der relativen Knochendichte (BV/TV) im Vergleich zur normalen osteochondralen Einheit, obwohl eine vollständige Reparatur nicht auftrat. Gleichzeitig unterschied sich die relative Knochendichte und die Knochenoberflächendichte (BS/TV) von rAAV-*lacZ*-behandelten Defekten signifikant von den Werten der normalen osteochondralen Einheit. Keine signifikanten Veränderungen zwischen rAAV-behandelten Zonen und normaler osteochondraler Einheit fand man hingegen in Betrachtung der subartikulären Spongiosa. Eine detaillierte mikrostrukturelle Analyse durch das Mikro-CT wurde in einer Kleintierstudie am Kaninchenmodell von Fukuda *et al.* im ähnlichen Kontext durchgeführt [78]. Hier wurde die Integration FGF-2-beladener (500 ng) 3D-Polyethylenkonstrukte in osteochondrale Defekte evaluiert. In einer weiteren Studie wurde FGF-2 durch eine doppelschichtige Membran in vollschichtigen Defekten freigesetzt. Hier beobachtete man eine Hochregulierung von TGF- β 2, VEGF, FGF-2, BMP-2,-3 und -4, was zu einer verbesserten Knorpelreparatur führte [140]. In unserer Studie wurde FGF-2 ausschließlich im knorpeligen Reparaturgewebe immunhistochemisch nachgewiesen.

Daher ist davon auszugehen, dass lokale Überexpression von FGF-2 die Reparatur des subchondralen Knochens durch parakrine Mechanismen fördert [186]. Frisbie *et al.* beobachteten in arthrotisch verändertem Knochen und bei einigen Tieren eine verbreiterte und dichtere subchondrale Knochenplatte im Großtiermodell des Pferdes [73]. Ebenso war die subartikuläre Spongiosa verbreitert [212], die Knochenmineraldichte vermindert und die Integrität der trabekulären Strukturen verändert [129]. In Betrachtung dieser Parameter fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen hFGF-2- behandelten Defekten, *lacZ*- Kontrolldefekten und normaler osteochondralen Einheit.

7.2 Wirkung des rAAV-basierten Gentransfers auf den angrenzenden Knorpel

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, einen positiven Effekt der rAAV-vermittelten hFGF-2 Applikation auf den umgebenden Knorpel nachzuweisen. Dies erfolge im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-behandelten Kontrollgruppe. Fokale Knorpelläsionen führen zur Ausprägung einer Arthrose, wenn sie nicht behandelt werden [76]. In makroskopischer Betrachtung nach dem Bewertungssystem nach Goebel *et al.* stellten wir eine signifikant geringere Degeneration des umliegenden Knorpelgewebes nach Behandlung eines osteochondralen Defektes mit rAAV-hFGF-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Die Rolle von FGF-2 als chondroprotektiver Wachstumsfaktor wird kontrovers diskutiert. Gegensätzliche Einflüsse auf die Knorpelhomöostase beobachtete man in Studien an verschiedenen Spezies [139]. Dabei spielt die Regulation FGF-2-spezifischer Rezeptoren eine Rolle, die entweder katabolische oder anabolische Prozesse induziert [59]. Gleichzeitig zeigen andere Vertreter der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie eine vielversprechende Wirkung, um Knorpeldegenerationen zu verhindern [59]. Fibroblasten-Wachstumsfaktor 18 (FGF-18) ist wie FGF-2 ebenfalls ein Mitglied der FGF-Familie [110]. Rekombinant produzierter humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor 18 (rhFGF18) wird derzeit in Phase-II-Studien als sicherer, intraartikulär verabreichter therapeutischer Faktor zur Behandlung von Arthrose getestet [53,108,144]. Die histologische Degeneration des angrenzenden Knorpels von *lacZ*-behandelten Defekten sowie hFGF-2-behandelten Defekten evaluierten wir mit Hilfe des Bewertungssystems nach Little *et al.* [142] und unterschieden zwischen einer dem Defekt lateral angrenzenden und medial angrenzenden Zone. Interessanterweise war im mittleren Gesamtpunktwert eine geringere Degeneration des angrenzenden

Knorpelgewebes der *lacZ*-behandelten Gruppe zu beobachten. Dies zeigte sich auch in Betrachtung der biochemischen Parameter. Hier war die Zellzahl (DNS-Gehalt) im angrenzenden Knorpel von *lacZ*-behandelten Defekten signifikant niedriger und das Proteoglykan/DNS-Verhältnis ausgeglichener als in der hFGF-2-behandelten Gruppe. Gleichzeitig war der Parameter „Chondrozytendichte“ im Bewertungssystem nach Little *et al.* in der hFGF-2-behandelten Gruppe erhöht. Eine Korrelation fand sich auch zwischen erhöhtem Proteoglykangehalt und vermehrter Intensität der Safranin O/Echtgrün-Färbung im benachbarten Knorpel der hFGF-2-behandelten Gruppe. Interessanterweise zeigten sich aber auch unterschiedliche Ausprägungen der Degeneration innerhalb der Gruppen unter Berücksichtigung der lateralen oder medialen Lokalisation. So war die Degeneration in der lateral angrenzenden Zone vermehrt zu beobachten. Grund dafür könnte eine erhöhte mechanische Druckbelastung des Reparaturgewebes in der lateralen Zone durch eine geringe Lateralisation der Patella sein.

Zusammenfassend fanden sich signifikante, bildmorphologische Unterschiede in der Betrachtung des perifokalen Knorpelgewebes zwischen rAAV-hFGF-2 und der Kontrollgruppe. Ebenso zeigt sich ein signifikant vermehrter DNS-Gehalt des perifokalen hFGF-2-behandelten Knorpelgewebes im Vergleich zur *lacZ*-Kontrollgruppe. Die histologische Betrachtung des angrenzenden Knorpelgewebes weist regionale Unterschiede auf, welche statistisch nicht signifikant unterschiedlich waren.

7.3 Vorgehensweise

7.3.1 Analyseverfahren

Das Bewertungssystem nach Goebel *et al.* [85] wurde für die Evaluation der Knorpelreparatur in experimentellen Großtiermodellen entwickelt. Dabei korreliert der individuelle Parameter der „Defektfüllung“ am stärksten mit MRT-Analysen im Vergleich zu anderen Bewertungssystemen. Dieser Parameter zeigt sich in beiden hier angewandten Bewertungssystemen zugunsten der hFGF-2-behandelten Defekten verbessert. Das Bewertungssystem nach Smith *et al.* (*Oswestry Arthroscopy Score*, OAS) wurde ursprünglich für die arthroskopische Evaluation von Knorpeldefekten entwickelt [241] und in modifizierter Form in dieser Studie angewandt. Verzichtet wurde hierbei auf die Überprüfung der „Steifigkeit der Probe“. Diese wird im klinischen Gebrauch intraoperativ durch einen Tasthaken evaluiert. Der Gesamtpunktwert reduziert sich daher von 10 auf 8 Punkte. Insgesamt lässt die makroskopische Evaluation des

Reparaturgewebes durch das Bewertungssystem nach Goebel *et al.* eine genauere Analyse zu. Hier werden pro Kategorie bis zu 4 Punkte vergeben (im Vergleich zum OAS: max. 2 Punkte/Kategorie). Dabei korrelieren die Kategorien „Defektfüllung“, „Defektintegration“ und der Gesamtpunktwert mit den korrespondierenden Kategorien der histologischen Bewertungssysteme [86]. Es findet in Groß- und Kleintier-Modellen Anwendung [51,165,217].

Die histologische Bewertung gilt in der Analyse von Knorpelreparatursystemen als Goldstandart [206]. In dieser Studie verwendeten wir etablierte Bewertungssysteme für die histologische Beurteilung des Reparaturgewebes sowie des umliegenden Knorpels. Das von Sellers und Kollegen [235] beschriebene Bewertungssystem ist im Vergleich zu den häufig angewandten Bewertungssystemen nach Wakitani und Mitarbeitern [261] sowie Pineda und Mitarbeitern [218] komplexer. Alle etablierten Bewertungssysteme weisen in einer Übersichtsarbeit von Orth *et al.* eine hohe Intra- und Interobserver-Variabilität auf [206]. Die histologische Analyse des angrenzenden Knorpelgewebes wird durch das Bewertungssystem nach Little *et al.* [142] ergänzt. Dieses System wurde für die Bewertung von Arthrose in Großtiermodellen (Schafe und Ziegen) entwickelt. Ergänzt wurde die histologische Auswertung durch immunhistochemische Analysen. Durch ein semiquantitatives Bewertungssystem [197] konnte hier die Intensität der Typ-II- und Typ-I-Kollagenausprägung im histologischen Schnitt mit einer Negativkontrolle verglichen werden. Visualisiert wurden die Kollagenfibrillen auch durch Hilfe eines zusätzlichen optischen Filters und Verwendung der Polarisationsmikroskopie. Die Anordnung der Fibrillen innerhalb des Reparaturgewebes sowie im angrenzenden Knorpel konnte so dargestellt werden [136]. Die biochemische Analyse des DNS- und Proteoglykan-Gehaltes im Reparaturgewebe sowie im anliegenden normalen Knorpelgewebe stellt einen Standard in der Analyse von gentherapeutischen Verfahren dar. Allerdings findet sie auch in der Analyse von klinischen Strategien der Knorpelreparatur Anwendung [58,208]. Zur detaillierten Beurteilung des subchondralen Knochens dient die mikro-computertomografische Analyse. Umbauprozesse in der subartikulären Spongiosa sowie der subchondralen Knochenplatte können hier durch Parameter der Mikrostruktur dargestellt werden [23]. Die dreidimensionale Untersuchung des Knochens wurde erstmals Ende der 80-er Jahre durch das Mikro-CT durchgeführt [68,131]. Die Auswahl der Einstellungsparameter der hier publizierten Studie beruht auf vorangegangene Studien am Schafmodell [58,199,208]. Zusammenfassend erlaubt die Verwendung dieser etablierten Verfahren die detaillierte Analyse der Reparatur der gesamten osteochondralen Einheit und stärkt damit die Aussagekraft dieser Studie.

7.3.2 Tiermodell

In dieser Studie verwendeten wir ein bilaterales, klinisch relevantes Großtiermodell am Schaf, um die Reparatur osteochondraler Defekte nach rAAV-Gentransfer zu analysieren. Es existiert kein Großtiermodell, welches das menschliche Kniegelenk und dessen biomechanischen Eigenschaften exakt widerspiegelt [1,10]. Großtiermodelle existieren für Schweine [83] und Huftiere [92,103]. Bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, wenn man fokale Knorpeldefekte in einer translationalen Studie adressieren möchte. Die Knorpeldicke nimmt mit der Größe des Tiermodells zu und hängt von der anatomischen Lokalisation im Gelenk ab [113]. Kreuz *et al.* [130] fanden heraus, dass kleine chondrale Läsionen in humanen Kondylen ein besseres Reparaturpotenzial als in der *Trochlea femoris* haben. Interessanterweise ist die Knorpelreparatur im Schafmodell in der *Trochlea femoris* besser als in den ovinen Kondylen [201]. Die humane Situation wird im hier verwendeten Modell mit trochleär gesetzten Defekten folglich besser dargestellt als bei kondylär gesetzten Defekten. Die chondroprotektive, anabole Wirkung von hFGF-2 unterscheidet sich in verschiedenen Spezies [139] und ist altersabhängig [271]. Ausgewachsene Tiere haben außerdem eine niedrigere spontane Heilungsrate und sind demnach besser für therapeutische Defektmodelle geeignet. Wir wählten sie daher für diese Studie aus. Madry *et al.* gaben Empfehlungen für die Auswahl eines geeigneten Tiermodells [162]. Diese Empfehlungen beachteten wir in der hier vorliegenden Studie. So bietet das Schafmodell wichtige Eigenschaften des humanen Kniegelenks, wie die relative Größe der artikulierenden Knochen, der Verlauf der Beinachse sowie der Aufbau der Bänder und Menisken [172,200,201]. Die Knorpeldicke im Schafsknie beträgt durchschnittlich 0,4 bis 0,5 mm und die des Menschen durchschnittlich 2,2 bis 2,5 mm [2,74,210]. Limitierend ist dabei die Tatsache, dass Schafe Vierfüßler sind und dadurch ein unterschiedliches Stand- und Gangbild bieten [201,227]. Zudem können Schafe ihre operierte Extremität nicht entlasten, was bei Patienten nach knorpeltherapeutischen Verfahren für sechs Wochen empfohlen wird. Das Kniegelenk des Schafes ist demnach postoperativ stärkeren biomechanischen Belastungen ausgesetzt [199]. Orth *et al.* zeigten, dass bei einem bilateralen Vergleich die Stichprobengröße ohne Veränderung der Standardabweichung und Durchschnittsdifferenz reduziert werden kann [202]. Durch den hier gewählten bilateralen Vergleich konnte die Anzahl der Versuchstiere signifikant minimiert und der Ausschluss von einem Tier aus den Auswertungen ohne Verlust der Teststärke kompensiert werden.

7.3.3 rAAV-Vektoren und FGF-2 als therapeutischer Faktor

Der humane Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 wurde in der vorliegenden Studie durch rAAV-vermittelten Gentransfer im Großtiermodell erfolgreich in osteochondrale Defekte eingebracht und überexprimiert. Die direkte Verabreichung von therapeutischen Genvektoren ist eine geeignete Methode, um die Reparaturmechanismen im Gelenkknorpel dauerhaft zu aktivieren [39,49,61,65]. In der vorliegenden Studie verwendeten wir ein virales Gentransfersystem. Allgemeine Nachteile von viralen Gentransfersystemen bestehen in ihrer potenziellen Immogenität [18,256,273], Onkogenität [5,141] und dem verbleibenden Restrisiko für den Erwerb einer Replikationskompetenz [249]. Adeno-assoziierte virale Vektoren gelten jedoch als sichere und effektive Gentransfersysteme [13,49,62]. Durch Modifikation von AAV-Vektoren und wiederholter systematischer Verabreichung kann die Immunantwort gesenkt und die Transduktionseffizienz trotz bestehender humoraler Immunität weiter gesteigert werden [180]. Ein ungelöstes Problem stellt jedoch die Dauer der Transgenexpression dar, da die optimalen Bedingungen der Steuerung der Chondrogenese bisher nicht vollständig verstanden werden. Die ideale Dauer der Transgenexpression bleibt daher weiterhin unklar [52]. Durch die Deletion der Replikationskassette besitzen sie eine sehr geringe Mutagenität [54,65]. Die Verwendung von rAAV-Vektoren zur Behandlung von chondralen oder osteochondralen Defekten ist etabliert. Die rAAV-vermittelte Überexpression therapeutischer Wachstumsfaktoren in isolierten mesenchymalen Stammzellen alleine [77,258] oder in Kombination [183,248] war *in vitro* bereits erfolgreich und bewährte sich als effizientes Werkzeug des Gentransfers. Eine rAAV-vermittelte Co-Überexpression von TGF- β /IGF-I gelang in humanen mesenchymalen Stammzell-Aggregaten erfolgreich nach deren Implantation in menschliche osteochondrale Explantate und ermöglicht somit Analysen des Gentransfers unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen [184]. Die Anwendung von Gentransfersystemen an translationalen Tiermodellen ist dennoch unerlässlich für die zukünftige Anwendung am Menschen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Reparaturprozesse in fokalen Knorpeldefekten an Klein- und Großtiermodellen (Kaninchen, Schweine, Huftiere) durch den adenoviralen oder rAAV-vektorbasierten Gentransfer von therapeutischen Faktoren wie IGF-I (alleine oder mit IL-1 Rezeptor-Antagonist), TGF- β , BMP und SOX9 getriggert werden [45,47,51,175,182]. Jedoch konnte bislang keiner dieser Studien eine Evidenz für einen definitiven Effekt auf die Verbesserung der Geweberegeneration in den behandelten Defekten nachweisen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung von Gentransferwerkzeugen mit höchster Effizienz und Langlebigkeit für die Therapie von Knorpeldefekten, vor allem für

den Einsatz in Großtiermodellen, welche die humane Situation am besten widerspiegeln [36,162].

Die Anzahl an experimentellen Studien über die Überexpression eines therapeutischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 durch einen Gentransfer in Zielzellen von Knorpeldefekten ist beschränkt [13]. FGF-2 in Kombination mit IGF-I wurde erfolgreich in osteochondrale Defekte eingebracht. In *ex vivo* (Kaninchenmodell) und *in vitro* Studien wurden Chondrozyten/Alginat-Sphäroide [197] sowie murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3)/Alginat-Sphäroide [157] als Transfersysteme genutzt. Als Expressionsvektoren dienten Plasmide. In einer *in vitro* Studie war die adenovirus-vermittelte Co-Expression von FGF-2 und IGF-I in adipösen mesenchymalen Stammzellen erfolgreich und führte zu einer vermehrten chondrogenen Differenzierung [82]. Kaul *et al.* transfizierten Chondrozyten mit Plasmidexpressionsvektoren für FGF-2 und transplantierten anschließend Chondrozyten/Alginat-Sphäroide in osteochondrale Defekte. FGF-2 konnte so in dieser *ex vivo* (Kaninchenmodell) und *in vitro* Studie erfolgreich überexprimiert werden. Die rAAV-vermittelte Überexpression von FGF-2 in mesenchymalen Stammzellen [44] oder Knochenmarkaspiraten [75] war in einigen *in vitro* Studien erfolgreich und gelang auch in humanen Fibrochondrozyten von Menisken [42] sowie in Fibroblasten im menschlichen Kreuzband [160]. Die (r)AAV-vermittelte FGF-2-Überexpression in osteochondralen oder chondralen Defekten wird nach unserem besten Wissen bislang nur im Kleintiermodell beschrieben [40,105,274]. Das Ziel dieser Studie war, den Gentransfer des reparativen Wachstumsfaktors FGF-2 [44,209,252] mit Hilfe klinisch adaptierter rAAV-Vektoren [39,65,158] in einem Großtiermodell (Schaf) von osteochondralen Defekten durchzuführen und über einen längeren Zeitraum (sechs Monate) aufrechtzuerhalten. Die Methode basierte auf zuvor publizierte Ergebnisse, welche das Potenzial dieses Therapieansatz bereits am Kleintiermodell (Kaninchen) unter Beweis stellten [40,105]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass die hFGF-2 Überexpression nach direkter rAAV-Applikation in osteochondrale Defekte am Schafmodell *in vivo* verlängert war (ca. 62% Effektivität für sechs Monate relativ zum rAAV-*lacZ*-Kontrollgentransfer). Gegenüber den Untersuchungsergebnissen im Kaninchenmodell, in welchen eine Expression von rAAV-FGF-2 über einen Zeitraum von vier Monaten aufrechterhalten wurde, war die Expression von hFGF-2 im vorliegenden Modell verlängert [40,105]. Die therapeutische Transgenexpression war in dieser Studie nur auf die Zielzellen der Vektorapplikation begrenzt. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu zuvor durchgeführten Studien von Hiraide *et al.* am Kaninchenmodell, wo eine FGF-2 Expression auch in Nicht-Zielzellen wie Synovialzellen beobachtet wurde [105]. Jedoch wurde in der Arbeit von Hiraide *et*

a/. eine intraartikuläre Injektion als Weg der Vektorapplikation gewählt, während in unserer Studie eine Arthrotomie als Zugangsweg durchgeführt und nur die Zielzellen der Knorpelreparatur innerhalb des Defektes für den Gentransfer adressiert wurden [40]. Eine Vektordissemination konnte durch den chirurgisch geschaffenen Zugangsweg verhindert werden.

Diese Arbeit bezieht sich auf die Evaluation der osteochondralen Reparatur auf einen beschränkten, mittelfristigen Zeitraum von sechs Monaten. Um langfristige Effekte der FGF-2-Applikation zu untersuchen, sollten in zukünftigen Studien längere Untersuchungszeiträume gewählt werden. Ebenso limitierte die Verwendung einer Einzeldosis des Vektors die vorliegende Arbeit. Eine verstärkte therapeutische Wirkung von hFGF-2 im Großtiermodell könnte in zukünftigen Arbeiten entweder durch die Applikation von höheren und/oder repetitiven Vektordosen hervorgerufen werden. Eine weitere Strategie, die Wirkung des therapeutischen Faktors zu verbessern, kann die simultane Gabe von additiven Faktoren sein. Hier weisen Faktoren wie IGF-I, TGF- β , SOX9 und/oder BMPs einen synergen Effekt zu FGF-2 auf [45,47,51,175,182]. In dieser Hinsicht sind rAAV-Vektoren gut geeignete Vehikel zur simultanen Gabe von separaten Genen, welche keine Interferenzen zwischen den Gentransferkonstrukten zeigen [248]. Alternativ können auch Strategien verwendet werden, welche auf der kontrollierten Freisetzung von rAAV-FGF-2 aus angepassten Biomaterialien basieren [111,166]. Diese Strategie bietet effektive Werkzeuge, um die räumliche und zeitliche Präsenz der therapeutischen Faktoren im Defekt zu verbessern [52]. Eine Überexpression von therapeutischen Faktoren mit Hilfe von Alginat- oder Kollagenträgersubstanzen gelang bereits erfolgreich in Kaninchenmodellen [34,123,197]. Die Überexpression von humanem FGF-2 nach nicht-viraler Transfektion in Alginat-Chondrozyten-Sphäroide verbesserte die Reparatur fokaler osteochondraler Defekte im Schafmodell in einer noch nicht veröffentlichten Arbeit [185]. Die hier durchgeführte Studie beschreibt eine direkte, rAAV-vermittelte Überexpression von humanem FGF-2 in fokalen osteochondralen Defekten erstmals am klinisch relevanten Großtiermodell.

7.4 Klinische Relevanz

Kartilaginäre und ossäre Bestandteile der osteochondralen Einheit besitzen unterschiedliche Heilungsdauer [198]. Um die Ergebnisse dieser Studie in klinisch anwendbare Methoden zu übersetzen, müssen daher weitere Langzeitstudien

durchgeführt werden. In einer randomisierten multizentrischen Studie von Knutsen *et al.* wurde zudem gezeigt, dass anfänglich gute Resultate der Knorpelreparatur (mittels ACT und Mikrofrakturierung) ein Risiko für Behandlungsversagen aufweisen und Patienten im Langzeitverlauf zudem häufig radiologische Zeichen einer Arthrose zeigen [126]. Gleichzeitig spielen Tiermodelle eine wichtige Rolle in der Entwicklung von neuen, experimentellen Therapiemethoden [46]. Besonders Großtiermodelle werden gebraucht, um neue chirurgische Techniken am Patienten anzuwenden [162], aber auch um die Komplexität der Pathophysiologie der osteochondralen Einheit zu verstehen. In der Entwicklung neuer chirurgischer Behandlungsmethoden von Arthrose oder fokalen Knorpeldefekten ist die Betrachtung der gesamten osteochondralen Einheit notwendig, da klinische Symptome wie Schmerzen oftmals bestehen bleiben, wenn in den Reparaturmethoden ausschließlich der Gelenkknorpel adressiert wird [137]. Vom translationalen Aspekt ist es unabdingbar, neue Therapiemethoden sorgfältig auf Sicherheit und Effizienz im Tiermodell zu evaluieren, bevor die Therapie am Menschen angewendet werden kann [137]. Im Jahr 2017 wurden fast 2600 klinische Gentherapiestudien für Krebskrankheiten, monogene Erbkrankheiten, Infektionskrankheiten, kardiovaskuläre Krankheiten sowie andere Erkrankungen abgeschlossen, fortgesetzt oder freigegeben [84]. Bis heute gelten rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren als vielversprechende Vektoren für die Gentherapie [13]. Ihre Verwendung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und Arthrose wird bereits in klinischen Studien erprobt [66]. Genetisch modifizierte Chondrozyten, welche durch einen retroviralen Vektor den Wachstumsfaktor TGF- β 1 überexprimierten, zeigten signifikante Verbesserungen in klinischen Bewertungssystemen in einer randomisierten Phase-II für die Behandlung von moderater Gonarthrose [135]. Wenn die Gentherapie als effektive Behandlungsmethode für idiopathische Arthrose zukünftig eingesetzt werden kann, wird sie sicherlich ein komplementäres Verfahren für etablierte chirurgische Behandlungstechniken wie die Tibiakopfumstellungsosteotomie, die uni- oder bikondyläre Knieendoprothetik darstellen [223].

Die Daten der vorliegenden Studie belegen nach unserem besten Wissen erstmalig, dass die therapeutische Expression von hFGF-2 nach direkter rAAV-Applikation *in vivo* einen großen Stellenwert besitzt, um fokale Knorpelverletzungen über einen längeren Zeitraum am klinisch relevanten Großtiermodell zu behandeln.

7.5 Zusammenfassung und Ausblick

In Zusammenschau verbessert die rAAV- vermittelte Überexpression von hFGF-2 die strukturelle Knorpelreparatur im Großtiermodell nach sechs Monaten. Dies konnte anhand verschiedener makroskopischer, histologischer und immunhistochemischer sowie biochemischer Parameter gezeigt werden. Diese Daten unterstützen das Potential einer direkten Applikation therapeutischer rAAV-Vektoren zur Behandlung von fokalen, osteochondralen Knorpeldefekten. Die Kombination viraler Gentransfermethoden mit *tissue engineering* Konzepten besitzt das Potenzial, klinische Anwendung zu finden [52] und hat das Ziel, Vektoren kontrolliert freizusetzen. Die Optimierung der Freisetzungsprozesse der Vektoren von Trägermaterialien stellt dabei die nächste Herausforderung dar, um die Knorpelreparatur *in vivo* zu verbessern [52]. Die Verwendung von Biomaterialien kann auch mit Methoden aus dem Bereich der Genom-Editierung kombiniert werden. Genom-Editierung ist eine vielversprechende Technologie die es erlaubt, das Erbgut von lebenden Zellen mit spezifischen, modifizierten Gensequenzen präzise zu verändern [3]. Biokompatible Materialien sind vielfältig verfügbar, jedoch besteht kein Konsens über das beste Material oder die beste Technik [240]. Weiterführende Arbeiten müssen überprüfen, ob sich Vor- oder Nachteile des rAAV-vermittelten Gentransfers in Kombination mit Trägermaterialien zeigen. Gleichzeitig müssen Therapieansätze überprüft werden, die FGF-2 mit anderen therapeutischen Faktoren kombinieren mit dem Ziel, die Degeneration des angrenzenden Knorpels zu reduzieren. Die Betrachtung der gesamten osteochondralen Einheit ist unabdingbar. Der unterschiedliche Anspruch der Gewebearten (Knorpel-*versus* Knochengewebe) auf die Biomechanik macht in der Zukunft aber auch biomechanische Analysen notwendig. Eine erfolgreiche Behandlung fokaler Knorpeldefekte ist am Ehesten durch eine Kombination verschiedener Therapieansätze erreichbar. Weitere *in vivo*-Studien zu präklinischen Modellen sind notwendig, um den optimalen viralen Vektor, die optimale Genkombination und Auswahl an therapeutischen (Wachstums-)Faktoren ohne oder mit Trägersubstanz zu finden, bevor eine Therapie am Menschen angewendet werden kann [260]. Die Verabreichung therapeutischer rAAV-Vektoren eröffnet in naher Zukunft neue, vielversprechende Möglichkeiten zur Verbesserung der osteochondralen Reparatur auf dem Gebiet der Orthopädie und orthopädischen Chirurgie.

8. Literaturverzeichnis

1. Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Lavery S, Little CB, McIlwraith W, Kraus VB (2010) Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthr Cartil* 18 Suppl 3:S2-6
2. Allen MJ, Houlton JEF, Adams SB, Rushton N (1998) The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. *Vet Surg* 27:596–605
3. Almaraz D, Cucchiaroni M, Loughlin J (2017) Genome editing for human osteoarthritis – a perspective. *Osteoarthr Cartil* 25:1195–1198
4. Ames RS, Lu Q (2009) Viral-mediated gene delivery for cell-based assays in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 4:243–256
5. Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808–13
6. Anraku Y, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, Takagi K, Hiraki Y (2008) The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthr Cartil* 16:961–964
7. Anraku Y, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, Hiraki Y (2009) Analyses of early events during chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. *J Bone Miner Metab* 27:272–286
8. Asahina I, Sampath TK, Hauschka P V (1996) Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 222:38–47
9. Asen A-K, Goebel L, Rey-Rico A, Sohler J, Zurakowski D, Cucchiaroni M, Madry H (2018) Sustained spatiotemporal release of TGF- β 1 confers enhanced very early chondrogenic differentiation during osteochondral repair in specific topographic patterns. *FASEB J* 32:5298–5311
10. Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC (1991) Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9:330–340

11. Barber FA, Dockery WD (2011) A Computed Tomography Scan Assessment of Synthetic Multiphase Polymer Scaffolds Used for Osteochondral Defect Repair. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 27:60–64
12. Barrie H (1987) Osteochondritis dissecans 1887-1987. A centennial look at Konig's memorable phrase. *J Bone Joint Surg Br* 69-B:693–695
13. Bellavia D, Veronesi F, Carina V, Costa V, Raimondi L, De Luca A, Alessandro R, Fini M, Giavaresi G (2018) Gene therapy for chondral and osteochondral regeneration: Is the future now? *Cell Mol Life Sci* 75:649–667
14. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10:440–447
15. Berndt AL, Harty M (1959) Transchondral fractures (osteochondritis dissecans) of the talus. *J Bone Joint Surg Am* 41-A:988–1020
16. Berns KI, Linden RM (1995) The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17:237–245
17. Berns KI, Muzyczka N (2017) AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther* 28:308–313
18. Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier M-C (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 11:10–17
19. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89
20. Bonnet CS (2005) Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44:7–16
21. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio AG, Mavilio F (1995) Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA-Immunodeficient Patients. *Science* (80-) 270:470–475
22. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C (2010) Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population:

- implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 21:704–712
23. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468–1486
 24. Brittberg M, Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Jt Surgery-American Vol* 85:58–69
 25. Brix M, Kaipel M, Kellner R, Schreiner M, Apprich S, Boszotta H, Windhager R, Domayer S, Trattnig S (2016) Successful osteoconduction but limited cartilage tissue quality following osteochondral repair by a cell-free multilayered nano-composite scaffold at the knee. *Int Orthop* 40:625–632
 26. Bruns J (1997) Osteochondrosis dissecans. *Der Orthopäde* 26:573–584
 27. Buckwalter JA (1998) Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sport Phys Ther* 28:192–202
 28. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54:465–480
 29. Burr DB (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 12 Suppl A:20–30
 30. Camp CL, Stuart MJ, Krych AJ (2014) Current Concepts of Articular Cartilage Restoration Techniques in the Knee. *Sport Heal A Multidiscip Approach* 6:265–273
 31. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997) Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 254–69
 32. Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of Tissue Engineered Regeneration of Skeletal Tissues. *Clin Orthop Relat Res* 367:12–16
 33. Carey JL, Shea KG, Lindahl A, Vasiliadis HS, Lindahl C, Peterson L (2020) Autologous Chondrocyte Implantation as Treatment for Unsalvageable Osteochondritis Dissecans: 10- to 25-Year Follow-up. *Am J Sports Med* 48:1134–1140

34. Che JH, Zhang ZR, Li GZ, Tan WH, Bai XD, Qu FJ (2010) Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 18:496–503
35. Christensen BB, Foldager CB, Jensen J, Jensen NC, Lind M (2016) Poor osteochondral repair by a biomimetic collagen scaffold: 1- to 3-year clinical and radiological follow-up. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 24:2380–2387
36. Chu CR, Szczodry M, Bruno S (2010) Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 16:105–15
37. Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y (2004) One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthr Cartil* 12:834–42
38. Council NR (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. National Academies Press, Washington, D.C.
39. Cucchiari M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7:1495–1509
40. Cucchiari M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF (2005) Improved Tissue Repair in Articular Cartilage Defects in Vivo by rAAV-Mediated Overexpression of Human Fibroblast Growth Factor 2. *Mol Ther* 12:229–238
41. Cucchiari M, Heiligenstein S, Kohn D, Madry H (2009) Molekulare Werkzeuge zur Wiederherstellung von arthrotischem Knorpel. *Der Orthopäde* 38:1063–1070
42. Cucchiari M, Schetting S, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H (2009) rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and α -SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther* 16:1363–1372
43. Cucchiari M, Madry H (2010) Genetic modification of mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Biomed Mater Eng* 20:135–143
44. Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H (2011) Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17:1921–1933

45. Cucchiarini M, Orth P, Madry H (2013) Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J Mol Med* 91:625–636
46. Cucchiarini M, Madry H, Guilak F, Saris D, Stoddart M, Koon Wong M, Roughley P (2014) A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cells Mater* 27s:12–16
47. Cucchiarini M, Madry H (2014) Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* 21:811–819
48. Cucchiarini M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H (2015) New trends in articular cartilage repair. *J Exp Orthop* 2:8
49. Cucchiarini M (2016) Human gene therapy: novel approaches to improve the current gene delivery systems. *Discov Med* 21:495–506
50. Cucchiarini M, Rey-Rico A (2017) Controlled Gene Delivery Systems for Articular Cartilage Repair. *Adv Struct Mater* 66:261–300
51. Cucchiarini M, Asen A-K, Goebel L, Venkatesan JK, Schmitt G, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Madry H (2018) Effects of TGF- β Overexpression via rAAV Gene Transfer on the Early Repair Processes in an Osteochondral Defect Model in Minipigs. *Am J Sports Med* 46:1987–1996
52. Cucchiarini M, Madry H (2019) Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nat Rev Rheumatol* 15:18–29
53. Dahlberg LE, Aydemir A, Muurahainen N, G hring H, Fredberg Edebo H, Krarup-Jensen N, Ladel CH, Jurvelin JS (2016) A first-in-human, double-blind, randomised, placebo-controlled, dose ascending study of intra-articular rhFGF18 (sprifermin) in patients with advanced knee osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 34:445–50
54. Daya S, Berns KI (2008) Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583–593
55. Dhollander AAM, Liekens K, Almqvist KF, Verdonk R, Lambrecht S, Elewaut D, Verbruggen G, Verdonk PCM (2012) A Pilot Study of the Use of an

- Osteochondral Scaffold Plug for Cartilage Repair in the Knee and How to Deal With Early Clinical Failures. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 28:225–233
56. Díaz-Rodríguez P, Rey-Rico A, Madry H, Landin M, Cucchiari M (2015) Effective genetic modification and differentiation of hMSCs upon controlled release of rAAV vectors using alginate/poloxamer composite systems. *Int J Pharm* 496:614–626
57. Edmonds EW, Polousky J (2013) A Review of Knowledge in Osteochondritis Dissecans: 123 Years of Minimal Evolution from König to the ROCK Study Group. *Clin Orthop Relat Res* 471:1118–1126
58. Eldracher M, Orth P, Cucchiari M, Pape D, Madry H (2014) Small Subchondral Drill Holes Improve Marrow Stimulation of Articular Cartilage Defects. *Am J Sports Med* 42:2741–2750
59. Ellman MB, Yan D, Ahmadiania K, Chen D, An HS, Im HJ (2013) Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *J Cell Biochem* 114:735–742
60. Erlacher L, Ng CK, Ullrich R, Krieger S, Luyten FP (1998) Presence of cartilage-derived morphogenetic proteins in articular cartilage and enhancement of matrix replacement in vitro. *Arthritis Rheum* 41:263–273
61. Evans CH, Robbins PD (1995) Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am* 77:1103–14
62. Evans CH, Ghivizzani SC, Oligino TA, Robbins PD (2001) Future of adenoviruses in the gene therapy of arthritis. *Arthritis Res* 3:142–146
63. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Wasko MC, Tomaino MM, Kang R, Muzzonigro TA, Vogt M, Elder EM, Whiteside TL, Watkins SC, Herndon JH (2005) Gene transfer to human joints: Progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 102:8698–8703
64. Evans CH, Gouze E, Gouze J-N, Robbins PD, Ghivizzani SC (2006) Gene therapeutic approaches-transfer in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 58:243–58
65. Evans CH, Huard J (2015) Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* 11:234–242

66. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD (2018) Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther* 29:2–14
67. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G (2010) Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop* 34:621–630
68. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt MA, Jasion G, Kleerekoper M (2009) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4:3–11
69. Findlay DM, Kuliwaba JS (2016) Bone-cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. *Bone Res* 4:16028
70. Fortier LA, Deak MM, Semevolos SA, Cerione RA (2004) Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res* 22:436–445
71. Franke O, Durst K, Maier V, Göken M, Birkholz T, Schneider H, Hennig F, Gelse K (2007) Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. *Acta Biomater* 3:873–881
72. Frenz DA, Liu W, Williams JD, Hatcher V, Galinovic-Schwartz V, Flanders KC, Van de Water TR (1994) Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development* 120:415–424
73. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW (1999) Arthroscopic Subchondral Bone Plate Microfracture Technique Augments Healing of Large Chondral Defects in the Radial Carpal Bone and Medial Femoral Condyle of Horses. *Vet Surg* 28:242–255
74. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW (2006) A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19:142–6
75. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Zawada AM, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2016) Effects of rAAV-mediated FGF-2 gene transfer and overexpression upon the chondrogenic differentiation processes in human bone

- marrow aspirates. *J Exp Orthop* 3:16
76. Frisch J, Cucchiari M (2016) Gene- and Stem Cell-Based Approaches to Regulate Hypertrophic Differentiation in Articular Cartilage Disorders. *Stem Cells Dev* 25:1495–1512
77. Frisch J, Orth P, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Kohn D, Madry H, Cucchiari M (2017) Genetic Modification of Human Peripheral Blood Aspirates Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Articular Cartilage Repair with a Focus on Chondrogenic Transforming Growth Factor- β Gene Delivery. *Stem Cells Transl Med* 6:249–260
78. Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Okazaki K, Tsuta K, Shikinami Y, Uchida A (2005) Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 26:4301–4308
79. Gaissmaier C, Fritz J, Schewe B, Weise K, Mollenhauer J, Aicher W (2006) Cartilage Defects: Epidemiology and Natural History. *Osteosynthesis Trauma Care* 14:188–194
80. Gao L, Orth P, Cucchiari M, Madry H (2019) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Am J Sports Med* 47:222–231
81. Gao X, Kim K-S, Liu D (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* 9:E92-104
82. Garza-Veloz I, Romero-Diaz VJ, Martinez-Fierro ML, Marino-Martinez IA, Gonzalez-Rodriguez M, Martinez-Rodriguez HG, Espinoza-Juarez MA, Bernal-Garza DA, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A (2013) Analyses of chondrogenic induction of adipose mesenchymal stem cells by combined co-stimulation mediated by adenoviral gene transfer. *Arthritis Res Ther* 15:R80
83. Gelse K, Mühle C, Knaup K, Swoboda B, Wiesener M, Hennig F, Olk A, Schneider H (2008) Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1 α activity. *Osteoarthr Cartil* 16:1457–1465

84. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR (2018) Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 20:e3015
85. Goebel L, Orth P, Muller A, Zurakowski D, Bucker A, Cucchiaroni M, Pape D, Madry H (2012) Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T-- comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthr Cartil* 20:1046–1055
86. Goebel L, Orth P, Cucchiaroni M, Pape D, Madry H (2017) Macroscopic cartilage repair scoring of defect fill, integration and total points correlate with corresponding items in histological scoring systems - a study in adult sheep. *Osteoarthr Cartil* 25:581–588
87. Goldring MB, Fukuo K, Birkhead JR, Dudek E, Sandell LJ (1994) Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 54:85–99
88. Goldring SR, Goldring MB (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 12:632–644
89. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 18:434–447
90. Goncalves MAF V (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2:43
91. Gonzalez-Fernandez T, Kelly DJ, O'Brien FJ (2018) Controlled Non-Viral Gene Delivery in Cartilage and Bone Repair: Current Strategies and Future Directions. *Adv Ther* 1:1800038
92. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ (2007) Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br* 89-B:672–685
93. Grande DA, Mason J, Light E, Dines D (2003) Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl:111–6

94. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Niu J, Quinn EK, Crema MD, Nevitt MC, Torner J, Lewis CE, Felson DT (2017) Brief Report: Partial- and Full-Thickness Focal Cartilage Defects Contribute Equally to Development of New Cartilage Damage in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol* 69:560–564
95. Guo X, Park H, Young S, Kretlow JD, van den Beucken JJ, Baggett LS, Tabata Y, Kasper FK, Mikos AG, Jansen JA (2010) Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Acta Biomater* 6:39–47
96. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B (2001) BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81:284–94
97. Hangody L, Füles P (2003) Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl:25–32
98. Harada Y, Wevers HW, Cooke TDV (1988) Distribution of bone strength in the proximal tibia. *J Arthroplasty* 3:167–175
99. Hardee C, Arévalo-Soliz L, Hornstein B, Zechiedrich L (2017) Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes (Basel)* 8:65
100. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN (2012) Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 20:423–435
101. Heiligenstein S, Cucchiari M, Laschke MW, Bohle RM, Kohn D, Menger MD, Madry H (2011) In vitro and in vivo characterization of nonbiomedical- and biomedical-grade alginates for articular chondrocyte transplantation. *Tissue Eng Part C Methods* 17:829–842
102. Hernandez-Sanchez C, Werner H, Roberts Jr. CT, Woo EJ, Hum DW, Rosenthal SM, LeRoith D (1997) Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J Biol Chem* 272:4663–4670

103. Hidaka C, Goodrich LR, Chen C-T, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ (2003) Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 21:573–583
104. Hinckel BB, Gomoll AH (2017) Autologous Chondrocytes and Next-Generation Matrix-Based Autologous Chondrocyte Implantation. *Clin Sports Med* 36:525–548
105. Hiraide A, Yokoo N, Xin K-Q, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T (2005) Repair of Articular Cartilage Defect by Intraarticular Administration of Basic Fibroblast Growth Factor Gene, Using Adeno-Associated Virus Vector. *Hum Gene Ther* 16:1413–1421
106. Hiraki Y, Shukunami C, Iyama K, Mizuta H (2001) Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthr Cartil* 9 Suppl A:S102-8
107. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 18:730–734
108. Hochberg MC, Guermazi A, Guehring H, Aydemir A, Wax S, Fleuranceau-Morel P, Reinstrup Bihlet A, Byrjalsen I, Ragnar Andersen J, Eckstein F (2019) Effect of Intra-Articular Sprifermin vs Placebo on Femorotibial Joint Cartilage Thickness in Patients With Osteoarthritis. *JAMA* 322:1360
109. Hötten GC, Matsumoto T, Kimura M, Bechtold RF, Kron R, Ohara T, Tanaka H, Satoh Y, Okazaki M, Shirai T, Pan H, Kawai S, Pohl JS, Kudo A (1996) Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors* 13:65–74
110. Hu MC-T, Qiu WR, Wang Y, Hill D, Ring BD, Scully S, Bolon B, DeRose M, Luethy R, Simonet WS, Arakawa T, Danilenko DM (1998) FGF-18, a Novel Member of the Fibroblast Growth Factor Family, Stimulates Hepatic and Intestinal Proliferation. *Mol Cell Biol* 18:6063–6074
111. Huang X, Yang D, Yan W, Shi Z, Feng J, Gao Y, Weng W, Yan S (2007) Osteochondral repair using the combination of fibroblast growth factor and amorphous calcium phosphate/poly(L-lactic acid) hybrid materials. *Biomaterials* 28:3091–100

112. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Jt Surg Am* 78:721–733
113. Hunziker EB (1999) Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res* S135-46
114. Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil* 10:432–463
115. Hüser D, Khalid D, Lutter T, Hammer E-M, Weger S, Heßler M, Kalus U, Tauchmann Y, Hensel-Wiegel K, Lassner D, Heilbronn R (2017) High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence. *J Virol* 91:e02137-16
116. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F (2000) Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* 35:581–8
117. Ismail HM, Miotla-Zarebska J, Troeberg L, Tang X, Stott B, Yamamoto K, Nagase H, Fosang AJ, Vincent TL, Saklatvala J (2016) Brief Report: JNK-2 Controls Aggrecan Degradation in Murine Articular Cartilage and the Development of Experimental Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ) 68:1165–71
118. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Jt Surg Am* 83-a:53–64
119. Jentsch KD, Wellmitz G, Heder G, Petzold E, Buntrock P, Oehme P (1980) A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration in vivo. *Acta Biol Med Ger* 39:967–971
120. Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54–69
121. Joseph GB, Baum T, Alizai H, Carballido-Gamio J, Nardo L, Virayavanich W, Lynch JA, Nevitt MC, McCulloch CE, Majumdar S, Link TM (2012) Baseline

- mean and heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years--data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthr Cartil* 20:727–735
122. Kato Y (1992) Roles of fibroblast growth factor and transforming growth factor- β families in cartilage formation. In: Adolphe M (ed) *Biological regulation of the chondrocytes*, CRC Press, Boca Raton, pp 141-160
123. Kaul G, Cucchiaroni M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H (2006) Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med* 8:100–111
124. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12:19–32
125. Kiernan JA (1999) *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 3rd edition. Butterworth Heinemann, Oxford; Auckland; Boston
126. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Ludvigsen TC, Løken S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2016) A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture. *J Bone Jt Surg* 98:1332–1339
127. Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G, Francioli S, Martin I, Pressato D, Arcangeli E, Quarto R, Sandri M, Marcacci M (2010) Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res* 28:116–24
128. Kon E, Filardo G, Perdisa F, Venieri G, Marcacci M (2014) Clinical results of multilayered biomaterials for osteochondral regeneration. *J Exp Orthop* 1:10
129. Kraus VB, Feng S, Wang S, White S, Ainslie M, Graverand M-PH Le, Brett A, Eckstein F, Hunter DJ, Lane NE, Taljanovic MS, Schnitzer T, Charles HC (2013) Subchondral Bone Trabecular Integrity Predicts and Changes Concurrently With Radiographic and Magnetic Resonance Imaging-Determined Knee Osteoarthritis Progression. *Arthritis Rheum* 65:1812–1821
130. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, Krause SJ, Lahm A, Niemeyer P, Ghanem N, Uhl M, Sudkamp N (2006) Is microfracture of chondral defects in the

- knee associated with different results in patients aged 40 years or younger?
Arthroscopy 22:1180–1186
131. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jasion G (1990) Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. J Orthop Res 8:833–842
 132. Kumagai K, Saito T, Koshino T (2003) Articular cartilage repair of rabbit chondral defect: promoted by creation of periarticular bony defect. J Orthop Sci 8:700–706
 133. Lane LB, Villacin A, Bullough PG (1977) The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. J Bone Joint Surg Br 59:272–8
 134. Lang G (2006) Immunhistochemie. In: Lang G (ed) Histotechnik. Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik, Springer Vienna, Vienna, pp 257-294
 135. Lee B, Parvizi J, Bramlet D, Romness DW, Guermazi A, Noh M, Sodhi N, Khlopas A, Mont MA (2020) Results of a Phase II Study to Determine the Efficacy and Safety of Genetically Engineered Allogeneic Human Chondrocytes Expressing TGF- β 1. J Knee Surg 33:167–172
 136. Lee JH, Xia Y (2013) Quantitative zonal differentiation of articular cartilage by microscopic magnetic resonance imaging, polarized light microscopy, and Fourier-transform infrared imaging. Microsc Res Tech 76:625–632
 137. Lepage SIM, Robson N, Gilmore H, Davis O, Hooper A, St. John S, Kamesan V, Gelis P, Carvajal D, Hurtig M, Koch TG (2019) Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. Tissue Eng Part B Rev 25:114–125
 138. Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozi F, Wright JF, Bushman FD, High KA (2011) Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. Blood 117:3311–3319
 139. Li X, Ellman MB, Kroin JS, Chen D, Yan D, Mikecz K, Ranjan KC, Xiao G, Stein GS, Kim S-G, Cole B, van Wijnen AJ, Im H-J (2012) Species-specific biological effects of FGF-2 in articular cartilage: Implication for distinct roles within the FGF

- receptor family. *J Cell Biochem* 113:2532–2542
140. Li X, Su G, Wang J, Zhou Z, Li L, Liu L, Guan M, Zhang Q, Wang H (2013) Exogenous bFGF promotes articular cartilage repair via up-regulation of multiple growth factors. *Osteoarthr Cartil* 21:1567–1575
141. Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Köhlcke K, Eckert H-G, Fehse B, Baum C (2002) Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296:497
142. Little CB, Smith MM, Cake MA, Read RA, Murphy MJ, Barry FP (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthr Cartil* 18 Suppl 3:80–92
143. Lo YY, Cruz TF (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270:11727–11730
144. Lohmander LS, Hellot S, Dreher D, Krantz EFW, Kruger DS, Guermazi A, Eckstein F (2014) Intraarticular Sprifermin (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 18) in Knee Osteoarthritis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol* 66:1820–1831
145. Lu XL, Mow VC (2008) Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc* 40:193–9
146. Luan Y, Praul CA, Gay C V., Leach RM (1996) Basic fibroblast growth factor: An autocrine growth factor for epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 62:372–382
147. Lusby E, Bohenzky R, Berns KI (1981) Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J Virol* 37:1083–1086
148. Lynch TS, Patel RM, Benedick A, Amin NH, Jones MH, Miniaci A (2015) Systematic review of autogenous osteochondral transplant outcomes. *Arthroscopy* 31:746–754

149. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J (2005) The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36:207–15
150. Madry H, Cucchiarini M, Stein U, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2003) Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med* 5:502–509
151. Madry H, Cucchiarini M, Terwilliger EF, Trippel SB (2003) Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 14:393–402
152. Madry H, Emkey G, Zurakowski D, Trippel SB (2004) Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* 6:238–245
153. Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2005) Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 12:1171–1179
154. Madry H, Wilmes P, Kohn D, Cucchiarini M (2007) Gentherapie für traumatische Defekte des Gelenkknorpels. *Phys Medizin, Rehabil Kurortmedizin* 17:12–19
155. Madry H (2008) Molekulare Therapie von traumatischen Knorpeldefekten. *Trauma und Berufskrankheit* 11:55–59
156. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 18:419–433
157. Madry H, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiarini M (2010) Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 130:1311–1322
158. Madry H, Orth P, Cucchiarini M (2011) Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage* 2:201–225

159. Madry H, Grun UW, Knutsen G (2011) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int* 108:669–677
160. Madry H, Kohn D, Cucchiari M (2013) Direct FGF-2 gene transfer via recombinant adeno-associated virus vectors stimulates cell proliferation, collagen production, and the repair of experimental lesions in the human ACL. *Am J Sports Med* 41:194–202
161. Madry H (2014) Gentransfer in der Kreuzbandchirurgie. *Der Orthopäde* 31:799–809
162. Madry H, Ochi M, Cucchiari M, Pape D, Seil R (2015) Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop* 2:9
163. Madry H, Orth P, Cucchiari M (2016) Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg* 24:e45-6
164. Madry H, Gao L, Eichler H, Orth P, Cucchiari M (2017) Bone Marrow Aspirate Concentrate-Enhanced Marrow Stimulation of Chondral Defects. *Stem Cells Int* 2017:1–13
165. Madry H, Gao L, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Müller-Brandt K, Cai X, Goebel L, Schmitt G, Speicher-Mentges S, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiari M (2020) Thermosensitive Hydrogel Based on PEO–PPO–PEO Poloxamers for a Controlled In Situ Release of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Effective Gene Therapy of Cartilage Defects. *Adv Mater* 32:1906508
166. Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A (2010) Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res* 28:677–686
167. Maglio M, Brogini S, Pagani S, Giavaresi G, Tschon M (2019) Current Trends in the Evaluation of Osteochondral Lesion Treatments: Histology, Histomorphometry, and Biomechanics in Preclinical Models. *Biomed Res Int* 2019:1–27
168. Manning WK, Bonner WM (1967) Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum* 10:235–239

169. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G, Josten C, Bader A (2011) Matrix-Associated Implantation of Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Versus Articular Chondrocytes. *Am J Sports Med* 39:1401–1412
170. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J-P, Roughley PJ (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:351–384
171. Martin JA, Buckwalter JA (2003) The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Jt Surgery-American* Vol 85:106–110
172. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51:292–9
173. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA (2000) Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 171–8
174. McCarty DM, Young SMJ, Samulski RJ (2004) Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38:819–845
175. Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, Flanigan DC, Jia G, Sammet S, Weisbrode SE, Knopp MV, Bertone AL (2011) Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthr Cartil* 19:1066–1075
176. Menetrey J, Unno-Veith F, Madry H, Van Breuseghem I (2010) Epidemiology and imaging of the subchondral bone in articular cartilage repair. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 18:463–471
177. Merkely G, Ackermann J, Lattermann C (2018) Articular Cartilage Defects: Incidence, Diagnosis, and Natural History. *Oper Tech Sports Med* 26:156–161
178. Mescher A (2013) Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13. edition. McGraw-Hill Education, New York City
179. Mienaltowski MJ, Huang L, Frisbie DD, McIlwraith CW, Stromberg AJ, Bathke AC, MacLeod JN (2009) Transcriptional profiling differences for articular cartilage and repair tissue in equine joint surface lesions. *BMC Med Genomics*

2:60

180. Mingozzi F, Anguela XM, Pavani G, Chen Y, Davidson RJ, Hui DJ, Yazicioglu M, Elkouby L, Hinderer CJ, Faella A, Howard C, Tai A, Podsakoff GM, Zhou S, Basner-Tschakarjan E, Wright JF, High KA (2013) Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci Transl Med* 5:194ra92
181. Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y (2004) Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12:586–96
182. Morisset S, Frisbie DD, Robbins PD, Nixon AJ, McIlwraith CW (2007) IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 462:221–8
183. Morscheid S, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M, Venkatesan JK (2019) Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomitant Gene Transfer and Overexpression of TGF-beta and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 20:E2591
184. Morscheid S, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Cucchiari M (2019) Remodeling of Human Osteochondral Defects via rAAV-Mediated Co-Overexpression of TGF-beta and IGF-I from Implanted Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *J Clin Med* 8:1326
185. Morscheid YP, Schmitt G, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiari M, Madry H (2019) Transplantation of articular chondrocytes overexpressing a human FGF-2 cDNA in an alginate hydrogel improves focal osteochondral repair in a sheep model. Posterbeitrag: ORS 2019 Annual Meeting Austin, TX, USA, Poster No. 1315
186. Morscheid YP, Cucchiari M, Venkatesan JK, Schmitt G, Orth P, Zurakowski D, Speicher-Mentges S, Menger MD, Laschke MW, Madry H (2020) rAAV-mediated human FGF-2 gene therapy enhances osteochondral repair in a clinically relevant large animal model over time in vivo. Eingereicht am 20.03.2020: *Am J Sports Med*, unter Begutachtung
187. Moses M, Sudhalter J, Langer R (1990) Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* (80-) 248:1408–1410

188. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* (80-) 260:926–932
189. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1113–1118
190. Noyes FR, Stabler CL (1989) A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sport Med* 17:505–513
191. O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Jt Surg Am* 80:1795–1812
192. Oegema TR, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC (1997) The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech* 37:324–332
193. Oesser S, Seifert J (2003) Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 311:393–9
194. Ohashi S, Kubo T, Kishida T, Ikeda T, Takahashi K, Arai Y, Terauchi R, Asada H, Imanishi J, Mazda O (2002) Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1530–1535
195. Oláh T, Madry H (2018) The Osteochondral Unit: The Importance of the Underlying Subchondral Bone. In: Farr J, Gomoll A H (eds) *Cartilage Restoration*, Springer International Publishing, Cham, pp 13-22
196. Orth P, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiari M, Madry H (2008) Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol* 38:137–144
197. Orth P, Kaul G, Cucchiari M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Madry H (2011) Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc* 19:2119–2130

198. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, Ong MF, Graber S, Kohn DM, Madry H (2012) Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthr Cartil* 20:1161–1169
199. Orth P, Goebel L, Wolfram U, Ong MF, Graber S, Kohn D, Cucchiarini M, Ignatius A, Pape D, Madry H (2012) Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sport Med* 40:828–836
200. Orth P, Madry H (2013) A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. *BMC Musculoskelet Disord* 14:5
201. Orth P, Meyer HL, Goebel L, Eldracher M, Ong MF, Cucchiarini M, Madry H (2013) Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *J Orthop Res* 31:1772–1779
202. Orth P, Zurakowski D, Alini M, Cucchiarini M, Madry H (2013) Reduction of Sample Size Requirements by Bilateral Versus Unilateral Research Designs in Animal Models for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 19:885–891
203. Orth P, Cucchiarini M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn DM, Madry H (2013) Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthr Cartil* 21:614–24
204. Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, Madry H (2013) Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair--translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater* 25:296–299
205. Orth P, Cucchiarini M, Wagenpfeil S, Menger MD, Madry H (2014) PTH [1-34]-induced alterations of the subchondral bone provoke early osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 22:813–821
206. Orth P, Madry H (2015) Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. *Histol Histopathol* 30:911–919
207. Orth P, Madry H (2016) Knorpeldefekte. *Arthroskopie* 29:68–74
208. Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiarini M, Madry H (2016) Small-Diameter

- Awls Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *Am J Sports Med* 44:209–19
209. Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ (1989) Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* 7:35–42
210. Osterhoff G, Löffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P (2011) Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee* 18:98–103
211. Oussedik S, Tsitskaris K, Parker D (2015) Treatment of Articular Cartilage Lesions of the Knee by Microfracture or Autologous Chondrocyte Implantation: A Systematic Review. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 31:732–744
212. Palmer AJR, Brown CP, McNally EG, Price AJ, Tracey I, Jezzard P, Carr AJ, Glyn-Jones S (2013) Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis. *Bone Joint J* 95-B:738–746
213. Pape D, Filardo G, Kon E, van Dijk CN, Madry H (2010) Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 18:448–462
214. Pareek A, Reardon PJ, Maak TG, Levy BA, Stuart MJ, Krych AJ (2016) Long-term Outcomes After Osteochondral Autograft Transfer: A Systematic Review at Mean Follow-up of 10.2 Years. *Arthroscopy* 32:1174–1184
215. Pascher A, Palmer GD, Steinert A, Oligino T, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Spector M, Robbins PD, Evans CH, Ghivizzani SC (2004) Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* 11:133–141
216. Pelletier JP, Martel-Pelletier J (1994) Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-1 in the physiopathology of osteoarthritis. *Rev Rhum Ed Fr* 61:103–108
217. Pfeifer CG, Fisher MB, Saxena V, Kim M, Henning EA, Steinberg DA, Dodge GR, Mauck RL (2017) Age-Dependent Subchondral Bone Remodeling and Cartilage Repair in a Minipig Defect Model. *Tissue Eng Part C Methods* 23:745–753

- 218. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A Semiquantitative Scale or Histologic Grading of Articular Cartilage Repair. *Cells Tissues Organs* 143:335–340
- 219. Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee. *J Bone Jt Surg Am* 41:618–619
- 220. Rey-Rico A, Cucchiaroni M (2016) Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater* 29:1–10
- 221. RKI (2013) Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheitsberichterstattung des Bundes H 54 - Arthrose
- 222. Roberts S, Menage J, Sandell LJ, Evans EH, Richardson JB (2009) Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *Knee* 16:398–404
- 223. Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA (2019) The Role of Gene Therapy in Cartilage Repair. *Arch bone Jt Surg* 7:79–90
- 224. Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD (1993) Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthr Cartil* 1:105–114
- 225. Rose JA, Maizel JVJ, Inman JK, Shatkin AJ (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 8:766–770
- 226. Rosenberg L (1971) Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Jt Surg Am* 53:69–82
- 227. Rudert M (2002) Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods. *Cells Tissues Organs* 171:229–240
- 228. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB (1994) Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 308:137–147
- 229. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1987) A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to

- study viral replication. *J Virol* 61:3096–3101
230. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63:3822–3828
231. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, Henrotin YE (2012) Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum* 64:1193–1203
232. Sanders TL, Pareek A, Obey MR, Johnson NR, Carey JL, Stuart MJ, Krych AJ (2017) High Rate of Osteoarthritis After Osteochondritis Dissecans Fragment Excision Compared With Surgical Restoration at a Mean 16-Year Follow-up. *Am J Sports Med* 45:1799–1805
233. Schaible H-G (2012) Mechanisms of chronic pain in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 14:549–56
234. Schofield JN, Wolpert L (1990) Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res* 191:144–148
235. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg Am* 79:1452–1463
236. Seno M, Masago A, Nishimura A, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Seno S, Yamada H (1998) BALB/c 3T3 cells co-expressing FGF-2 and soluble FGF receptor acquire tumorigenicity. *Cytokine* 10:290–294
237. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273:27467–27473
238. Shea KG, Jacobs JC, Carey JL, Anderson AF, Oxford JT (2013) Osteochondritis Dissecans Knee Histology Studies Have Variable Findings and Theories of Etiology. *Clin Orthop Relat Res* 471:1127–1136
239. Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y (1996) Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res* 14:265–272

- 240. Smith BD, Grande DA (2015) The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol* 11:213–222
- 241. Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, Erggelet C, Knutsen G, Garcia Portabella M, Smith T, Richardson JB (2005) Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy* 21:1462–1467
- 242. Spahn G, Hofmann GO (2014) Focal cartilage defects within the medial knee compartment. Predictors for osteoarthritis progression. *Z Orthop Unfall*
- 243. Spahn G, Stojanovic I, Müller-Obliers E, Aurich M, Baumgarten G, Plettenberg H, Kaschowitz T, Hoffmann M, Hofmann G (2015) Eigenschaften fokaler degenerativer Knorpelschäden am Kniegelenk. Eine radiologische, spektroskopische histologische und biochemische Untersuchung. *Sportverletz Sportschaden* 29:209–218
- 244. Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555–564
- 245. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH (1991) Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147:3915–3920
- 246. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopäde* 28:26–32
- 247. Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Søballe K, Barry F (2007) Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 13:93–9; discussion 99
- 248. Tao K, Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Lin J, Cucchiaroni M (2016) Co-overexpression of TGF- β and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 7:20
- 249. Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2:545–550

- 250. Trippel SB, Van Wyk JJ, Foster MB, Svoboda ME (1983) Characterization of a specific somatomedin-c receptor on isolated bovine growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 112:2128–2136
- 251. Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D, Doctrow SR (1993) Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone Jt Surg Am* 75:177–189
- 252. Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43:129–132
- 253. Trippel SB (1997) Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* 46:473–476
- 254. Ulrich-Vinther M, Duch MR, Soballe K, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Pedersen FS (2004) In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector. *J Orthop Res* 22:726–734
- 255. Vacanti CA, Upton J (1994) Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 21:445–462
- 256. Vandenberghe LH, Wilson JM (2007) AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* 7:325–333
- 257. Varady P, Li JZ, Cunningham M, Beres EJ, Das S, Engh J, Alden TD, Pittman DD, Kerns KM, Kallmes DF, Helm GA (2001) Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. *Hum Gene Ther* 12:697–710
- 258. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, Cucchiari M (2012) SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 3:22
- 259. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Wezel A, Madry H, Cucchiari M (2013) rAAV-mediated overexpression of TGF- β stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *J Transl Med* 11:211
- 260. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Cucchiari M (2019) Current Trends in Viral Gene Therapy for Human Orthopaedic Regenerative Medicine. *Tissue Eng Regen*

Med 16:345–355

261. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg Am* 76:579–592
262. Wehling P, Reinecke J, Baltzer AWA, Granrath M, Schulitz KP, Schultz C, Krauspe R, Whiteside TW, Elder E, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH (2009) Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 20:97–101
263. Weitzman MD, Linden RM (2011) Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807:1–23
264. Welton KL, Logterman S, Bartley JH, Vidal AF, McCarty EC (2018) Knee Cartilage Repair and Restoration: Common Problems and Solutions. *Clin Sports Med* 37:307–330
265. WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium (2003) The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organ Tech Rep Ser* 919:1–218
266. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, Koczy B (2008) Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 75:382–6
267. Willers C, Wood DJ, Zheng MH (2003) A current review on the biology and treatment of articular cartilage defects (Part I & Part II). *J Musculoskelet Res* 7:157–181
268. Wilson B, Novakofski KD, Donocoff RS, Liang Y-XA, Fortier LA (2014) Telomerase Activity in Articular Chondrocytes Is Lost after Puberty. *Cartilage* 5:215–220
269. Woolf AD, Pfleger B (2003) Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81:646–56
270. Wu Y, Li J, Kong Y, Chen D, Liu B, Wang W (2013) HSV-1 based vector mediated IL-1R α gene for knee osteoarthritis in rabbits. *J Cent South Univ Med*

Sci 38:590–6

- 271. Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K (2004) Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 12:636–641
- 272. Yang W, Cao Y, Zhang Z, Du F, Shi Y, Li X, Zhang Q (2018) Targeted delivery of FGF2 to subchondral bone enhanced the repair of articular cartilage defect. *Acta Biomater* 69:170–182
- 273. Yei S, Mittereder N, Tang K, O'Sullivan C, Trapnell BC (1994) Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Ther* 1:192–200
- 274. Yokoo N, Saito T, Uesugi M, Kobayashi N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Koshino T (2005) Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164–170
- 275. Zellner J, Grechenig S, Pfeifer CG, Krutsch W, Koch M, Welsch G, Scherl M, Seitz J, Zeman F, Nerlich M, Angele P (2017) Clinical and Radiological Regeneration of Large and Deep Osteochondral Defects of the Knee by Bone Augmentation Combined With Matrix-Guided Autologous Chondrocyte Transplantation. *Am J Sports Med* 45:3069–3080

9. Publikationen und *Abstracts*

Publikationen und Manuskripte

Morscheid YP, Cucchiarini M, Venkatesan J, Schmitt G, Orth P, Zurakowski D, Speicher-Mentges S, Menger MD, Laschke M, Madry H. rAAV-mediated human FGF-2 gene therapy enhances osteochondral repair in a clinically relevant large animal model over time *in vivo*. Zur Veröffentlichung eingereicht im *American Journal of Sports Medicine (AJSM)* am 30.03.20, aktuell unter Begutachtung (Manuskript-Nummer: AMJSPORTS/2020/304170).

Niemeyer P, Uhl M, Salzmann G, **Morscheid YP.**, Südkamp N, Madry H. Evaluation and analysis of graft hypertrophy by means of arthroscopy, biochemical MRI and osteochondral biopsies in a patient following autologous chondrocyte implantation for treatment of a full-thickness-cartilage defect of the knee. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2015, 135(6):819-830

Abstracts

Morscheid YP., Goebel L, Madry H. Struktur und Funktion des hyalinen Knorpels und des subchondralen Knochens. Vortrag auf dem NOVOCART® Anwendertreffen 2014 (Bochum)

Morscheid YP., Madry H. Cartilage and Osteoarthritis Research. Vortrag auf der Summer School of Experimental Surgery 2015 (Pilsen, Tschechische Republik)

Morscheid YP., Venkatesan J, Schmitt G, Menger MD, Laschke M, Cucchiarini M, Madry H. rAAV-mediated gene transfer of FGF-2 improves the repair of focal osteochondral defects in a translational sheep model. Posterpräsentation auf dem Orthopedic Research Society Congress 2018 (New Orleans, USA)

Morscheid YP, Venkatesan J, Zurakowski D, Menger MD, Laschke M, Cucchiarini M, Madry H. rAAV-vermittelter Gentransfer von humanem FGF-2 verbessert signifikant die Reparatur von fokalen osteochondralen Defekten - eine Studie im translationalen Schafmodell. Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie 2018 (Berlin); Nominierung als Kandidat für den Wilhelm-Roux-Preis

Morscheid YP., Schmitt G, Zurakowski D, Menger MD, Laschke M, Cucchiari M, Madry H. Transplantation of articular chondrocytes overexpressing a human FGF-2 cDNA in an alginate hydrogel improves focal osteochondral repair in a sheep model. *Moderierte Posterpräsentation auf dem Orthopedic Research Society Congress 2019 (Austin, USA)*

Morscheid YP, Zurakowski D, Menger MD, Laschke M, Cucchiari M, Madry H. Überexpression von humanen FGF-2 nach Transfektion in Alginat-Chondrozyten-Sphäroide verbessert die Reparatur fokaler osteochondraler Defekte im Schafmodell. *Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie 2019 (Berlin)*

10. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung der Universität des Saarlandes erstellt.

Mein aufrichtiger Dank gilt *Herrn Prof. Dr. med. Henning Madry* für seine geduldige Betreuung, fundierten und kritischen Anmerkungen, welche für mich stets lehrreich und eine große Hilfe waren.

Ein herzlicher Dank gilt auch an *Frau Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini* für ihre fachlich kompetenten Ratschläge und ihre intensive Betreuung.

Ich danke *Frau Gertrud Schmitt* für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die anregenden sowie motivierenden Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung, insbesondere *Herrn Prof. Dr. med. Patrick Orth* und *Herrn Dr. med. Lars Goebel*, danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. *Herrn Dr. rer. nat. Jagadeesh Venkatesan* danke ich für die Herstellung der Vektoren.

Mein Dank gilt auch *Herrn David Zurakowski* für die statistische Auswertung der histologischen Analysen. *Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger*, *Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke* und den Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie Homburg danke ich für die Narkose, die Tierhaltung und die technische Hilfe bei den Operationen an ihrem Institut.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre große Unterstützung in jeder Phase meines Studiums und der Promotion, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt *meiner Ehefrau Stephanie* für ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der Entstehung der Arbeit.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.